

[Tapez un texte]



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et
De la Recherche Scientifique



Université Abbès Laghrou Khenchela

Faculté des Sciences de la Nature Et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option: Microbiologie moléculaire et cellulaire

Thème :

Recherche de bactéries pathogènes dans les crèches de la ville de Khenchela

Présenté par :

M^{elle} BENAMARA Moufida

Devant le jury

Président :	M. DARBOUCHE A.	(Prof.)	Univ. AbbèsLaghrou - Khenchela
Encadreur :	M^{elle} YAKHLEF W.	(MAB)	Univ. AbbèsLaghrou - Khenchela
Examinatrice	M^{elle} KHEDDOUMA A.	(MAB)	Univ. AbbèsLaghrou - Khenchela
Examinatrice :	M^{elle} CHORFI K.	(EV)	Univ. AbbèsLaghrou- Khenchela

2013 – 2014

[Tapez un texte]

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience pour mener ce travail à bout.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et mes vives reconnaissances à Mademoiselle **YAKHLEF Wahiba**, Maître-assistante à l'Université Abbès Laghrour de Khenchela, qui a pris tout le soin de nous orienter et nous faire part de ses précieuses remarques surtout ses encouragements et sa disponibilité qui a grandement contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Une très grande reconnaissance va à Monsieur **DARBOUCHE Abdelhak**, Professeur à l'Université Abbès Laghrour de Khenchela, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

J'adresse également mes sincères remerciements à Mademoiselle **KHEDDOUMA Asma**, Maître-assistante à l'Université Abbès Laghrour de Khenchela, d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail.

Nous remercions chaleureusement Madame **CHORFI Keltoum**, enseignante à l'Université Abbès Laghrour de Khenchela et chef de paillasse de bactériologie à l'EPH 120 lits, qui a voulu participer à ce jury et pour l'aide précieuse qu'elle nous a apportée.

Je tiens également à exprimer ma gratitude et mon respect à mes estimables enseignants pour leur aimable aide et encouragements.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de bactériologie de l'EPH 120 lits Khenchela en particulier Monsieur **RMADNIA Rachid** qui a mis à notre disposition tout le matériel nécessaire pour la réalisation de ce travail.

Sans oublier de remercier **Mesdames les directrices des deux crèches** : madame **zrara** et madame **darhem** pour leur aimable accueil.

[Tapez un texte]

Dédicaces

Avec mes sentiments les plus sincères et mes émotions les plus intenses, je dédie ce travail :

A mes parents, pour leur soutien permanent dans mes études et dans ma vie, pour leur amour. Que Dieu vous préserve et vous prête longue vie de joie.

A mon frère « **Rafik** » et son épouse, pour vos aides et vos encouragements. Je vous souhaite tous le bonheur du monde, une vie pleine de joie et de succès.

A tous mes oncles et tantes, mes cousines :**Souhila,Assia,Hiba,Hayet.**

Qu'il me soit permis d'exprimer toute ma profonde gratitude à Mrs **Zidane Saaid** qui m'a soutenu et donné la chance de travailler au niveau du laboratoire de bactériologie de l'hôpital 120 lits kenchela.

A ma chère et mon amie « **Nouha** » qui ma soutenu et m'*encouragé pendant mon cursus je t'aime ma sœur.*

A mes amis :

Hadia,Wafa ,Liela,Amina,Salima,Aicha,Mouchira,Nasira,kahina,Abderezzak,Sofiene,merci infiniment pour tes aides.

Enfin A tous mes collègues et amis de promotion, à tous ceux qui, par leur présence et leur amitié.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Types de toxines bactériennes	04
Tableau 02 : Les principaux groupes bactériens d'intérêt médical.....	05
Tableau 03 : Principaux virus pathogènes.	09
Tableau 04 : Principales maladies parasitaires.....	10
Tableau 05 : Les principales mycoses.....	12
Tableau 06 : Etapes nécessaires à la transmission d'un agent infectieux.....	13
Tableau 07 : Probabilité de la colonisation par <i>S.pneumoniae</i>	22
Tableau 08 : Le calendrier de vaccination recommandé par l'OMS	25
Tableau 09 : Renseignements des deux crèches.....	26
Tableau 10 : Sites des prélèvements dans les deux crèches.....	27
Tableau 11 : Résultats du dénombrement des colonies isolées.....	39
Tableau 12 : Résultats du dénombrement des colonies isolées de la deuxième crèche.....	41
Tableau 13 : Caractères microscopiques et biochimiques des isolats sélectionnés à partir de la gélose nutritive.....	42
Tableau 14 : Caractères microscopiques et biochimiques des isolats sélectionnés à partir de la gélose au sang.....	44
Tableau 15 : Caractères microscopiques et biochimiques des isolats sélectionnés à partir de la gélose Chapman.....	44
Tableau 16 : Caractères microscopiques et biochimiques des isolats sélectionnés à partir de la gélose Hektoen.....	44
Tableau 17 : Résultats de l'identification biochimique des Gram négatifs.....	46
Tableau 18 : Résultats de l'identification.....	47

[Tapez un texte]

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BCG : Le vaccin bilié de Calmette et Guérin

BK : Bacille de Koch

°C : Degré Celsius

DTCPh : Diphtérie, Tétanos, Coqueluche, Poliomyélite, *Haemophilus*

DTP : Diphtérie, Tétanos, Poliomyélite

IPD : *Invasive pneumococcal diseases*

ml : Millilitre

MST : Les *Maladies Sexuellement Transmissibles*

ORL : oto-rhino-laryngées

pH : Potentiel hydrogène

PMI : la Protection Maternelle Infantile

ROR : Rougeole, Oreillons et Rubéole

UFC : unité formant une *Colonie*

Liste des figures

Figure 1 : Structure générale d'une bactérie	02
Figure 2 : Rôle des composants bactériens dans le pouvoir pathogène.....	04
Figure 3 : Morphologie des virus.	08
Figure 4 : Structure des champignons (a), levures; (b), moisissures.....	11
Figure 5 : Ensemencement par la technique des cadrans.....	15
Figure 6 : Modèle d'un plan d'une crèche.....	18
Figure 7 : Facteurs de risque des infections invasives à pneumocoques (IPD) chez les enfants de moins de six mois	21
Figure 8 : étapes sur lavage des mains sur les normes.....	24
Figure 09 : Technique d'ensemencement sur les quatre milieux gélosés.....	29
Figure 10 : Test de la coagulase.....	33
Figure 11 : Préparation de l'inoculum.....	37
Figure 12 : Ensemencement de la galerie.....	37
Figure 13 : Lecture de la galerie.....	38
Figure 14 : Identification de la souche.....	38

[Tapez un texte]

Listes des photographies

Photographie 01 : Ecouillons des prélèvements.....	27
Photographies 02 : Points de prélèvements (crèche I à gauche ; crèche II à droite).....	28
Photographie 03 : Etat frais et coloration de Gram des isolats sélectionnés.....	32
Photographie 04 : Test de la catalase.....	32
Photographie 05 : Préparation des galeries Api 20E.	34
Photographie 06 : Aspect macroscopique des colonies isolées de la première crèche après 24 H d'incubation à 37°C.....	40
Photographie 07 : Aspect macroscopique des colonies isolées de la deuxième crèche après 24 H d'incubation à 37°C.....	43
Photographie 08 : Résultats de la coloration de Gram.....	45
Photographie 09 : Résultats de la recherche de la coagulase et de la catalase.....	47

Table de matière

INTRODUCTION 01

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Agents infectieux

I. Définition 02

II. Classification02

1. Les bactéries02

1.1. Définition et pouvoir pathogène 02

1.2. Facteurs de Pathogénicité chez les bactéries 03

1.2.1. Le Glycocalyx 03

1.2.2. La capsule03

1.2.3. Les spores04

1.2.4. Les fimbriaes04

1.2.5. Les toxines 04

1.2.6. Les enzymes 04

2. Les virus 08

3. Les parasites 10

4. Les champignons..... 11

III. Réservoirs des agents infectieux 13

[Tapez un texte]

VI. Modes de propagation des maladies infectieuses.....	13
V. Techniques d'études des agents infectieux	14
1.La culture	14
2.L'isolement	14
3.L'identification.....	15
3.1 Identification phénotypique et morphologique.....	15
3.2 Identification biochimique, physiologique et métabolique.....	16

Chapitre II : Généralités sur les crèches

I. Historique.....	17
II. Définition	17
III. Aménagement	18
IV. Types de crèches	19
1. Crèches collectives	19
2. Crèches parentales	19
3. Crèches familiales	19
4. Crèches d'entreprise	20
V. Réglementation	20
VI. Risques infectieux liés aux crèches.....	21
VII. Principaux germes rencontrés en crèches	22
VIII. Prévention	23

[Tapez un texte]

MATERIEL ET METHODES

1. Cadre de travail.....	26
2. Échantillonnage	27
3. Enrichissement et Isolement	29
3.1. Gélose nutritive	29
3.2. Gélose au sang	29
3.3. Gélose Hektoen	30
3.4. Gélose Chapman	30
4. Identification	30
4.1. Caractères macroscopiques	30
4.2. Caractères microscopiques.....	31
4.2.1. Etat frais.....	31
4.2.2. Coloration de Gram	31
4.3. Caractères biochimiques.....	32
4.3.1. Test de la catalase.....	32
4.3.2. Test de la coagulase.....	33
4.3.3. Galerie biochimique.....	33

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Echantillonnage	39
--------------------------	----

[Tapez un texte]

2. Enrichissement et isolement	39
3. Dénombrement des colonies isolées	39
4. Etat frais et coloration de Gram	42
5. Identification des souches isolées	47

CONCLUSION

Liste des tableaux

Listes des figures

Listes des photographies

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUMES

[Tapez un texte]

A large, horizontally-oriented pink shape with a decorative border of small blue dots. The shape has a slightly irregular, hand-drawn appearance with rounded corners and a small notch at the top and bottom center. The word "INTRODUCTION" is centered within this shape in a bold, white, sans-serif font.

INTRODUCTION

[Tapez un texte]

Une crèche est un établissement d'accueil collectif destiné, généralement, aux enfants âgés entre deux mois à quatre ans. C'est un lieu qui permet à l'enfant de découvrir la vie en société et dont l'équipe d'encadrement et d'animation est principalement constituée d'éducatrices, d'assistantes maternelles, de puéricultrices, de psychologues, et de médecins pédiatres. (38).

Depuis quelques années, le nombre de crèches et de garderies d'enfants ne cesse d'augmenter. En revanche, bon nombre de ces crèches ne respectent pas les normes d'hygiène et de sécurité et emploient un personnel non-qualifié. (14). Une crèche accueille généralement entre trente à soixante enfants dans un espace relativement restreint. (2). Ainsi, la collectivité et la promiscuité qu'impose ce lieu fournissent un terrain idéal au développement et à la propagation des germes.


La non-vaccination et la vulnérabilité des enfants en bas âge constituent également des facteurs importants dans la transmission de diverses maladies infectieuses, notamment les infections cutanées, féco-orales, respiratoires, digestives et urinaires, chez les enfants fréquentant les crèches collectives.

Cette situation nous a incités à adopter ce travail qui porte sur l'estimation du niveau d'hygiène dans deux crèches privées situées dans la ville de Khenchela par la recherche de souches bactériennes potentiellement pathogènes.

En effet, notre étude s'articule sur les points suivants :

- La réalisation de multiples prélèvements à partir des endroits où les microbes sont susceptibles de se développer et de se transmettre ;
- L'enrichissement puis la culture des prélèvements effectués afin d'optimiser une meilleure croissance aux germes présents;
- Ensuite, le dénombrement puis l'identification des souches bactériennes isolées en étudiant leurs caractères microscopiques et biochimiques.

[Tapez un texte]



REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

[Tapez un texte]

I. Définition :

Un agent infectieux est un agent qui facilite la prolifération d'une infection et développe des toxines dans l'organisme. Il peut être de nature virale, bactérienne ou parasitaire. L'agent infectieux peut être retrouvé dans l'air, l'eau ou bien la terre. Il peut être inoffensif ou mortel pour l'homme et il n'est pas forcément contagieux [23].

II. Classification :

On distingue cinq types d'agents infectieux. Les bactéries, les virus, les parasites, les champignons et les prions.

2. Les bactéries :

2.1. Définition et pouvoir pathogène :

Une bactérie est un organisme vivant unicellulaire d'une taille microscopique. Une bactérie est dite pathogène lorsqu'elle est capable de provoquer une infection chez un sujet sain après pénétration dans l'organisme vivant et modification de la structure cellulaire de ses différents tissus. On parle alors de maladie bactérienne infectieuse [36].

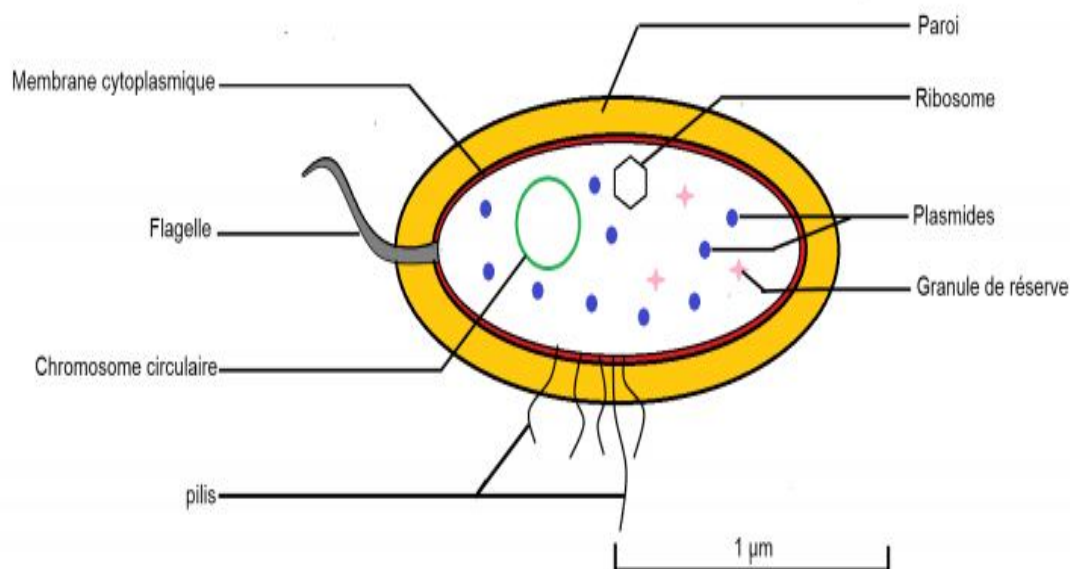


Figure 1 : Structure générale d'une bactérie [35].

Les bactéries sont classées en deux types selon leur pouvoir pathogène, des bactéries pathogènes appartenant à la flore commensale ou non et possédant des caractéristiques spécifiques leur permettant de déclencher une infection (*Haemophilus*, *Mycobacterium*

[Tapez un texte]

tuberculosis, Salmonella, Vibrio cholerae). Et des bactéries opportunistes habituellement incapables de déclencher de maladie chez les sujets sains. En revanche, elles peuvent devenir pathogènes chez les sujets aux défenses immunitaires altérées ou suite à une antibiothérapie. Ces bactéries sont souvent des bactéries commensales qui vivent à la surface de la peau et des muqueuses de l'homme, et des animaux [34, 33, 31].

Le pouvoir pathogène résulte d'une dissémination du microorganisme à partir de la porte d'entrée. Il existe deux types de bactéries pathogènes selon leur lieu de multiplication, des bactéries à multiplication intra-cellulaire comme le *Mycobacterium tuberculosis* (agent de la tuberculose), *Salmonella typhi* (agent de la typhoïde), *Listeria monocytogenes* (agent du listériose). Et des bactéries à multiplication extra-cellulaire causant le plus souvent des septicémies (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus*) des Pneumonies (*Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae.*) des Méningites (*Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae*) ou des endocardites (*Streptococcus, Enterococcus*) [34].

2.2. Facteurs de pathogénicité chez les bactéries :

Une bactérie est dite pathogène quand elle peut provoquer une perturbation physiologique plus ou moins grave. Ce pouvoir de pathogénicité est traduit notamment par la production de toxine, la pénétration dans l'organisme, l'adhésion, la multiplication ou la lésion des tissus [28].

1.2.1. Le Glycocalyx :

Fibres polysaccharidiques ou polymères extrêmement fréquents entourant la bactérie. Le feutrage des fibres de glycocalyx est constant dans le cas de bactéries vivant en biofilm dans les conditions naturelles. Il est responsable de l'attachement des bactéries aux cellules (buccales, respiratoires) ou à des supports inertes (plaque dentaire, biofilm sur les cathéters, sondes urinaires ou encore les prothèses). Il joue également un rôle dans la protection des bactéries du biofilm de la dessiccation et la résistance aux différents agents chimiques (antiseptiques, désinfectants, antibiotiques) [34].

1.2.2. La capsule :

L'élément superficiel facultatif, lié le plus souvent à un pouvoir pathogène en empêchant la phagocytose. C'est notamment le cas des pneumocoques.

[Tapez un texte]

1.2.3. Les spores :

Certaines bactéries, ont la propriété de se différencier en formes de survie appelées spores. Elles se présentent sous une forme végétative métaboliquement active ou métaboliquement inactive (forme sporulée) permet la survie dans le milieu extérieur des années (*Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*) [34].

1.2.4. Les fimbriaes :

Structure fibrillaires rigides permettant l'attachement spécifique des bactéries sur les cellules, ce qui présente une phase essentielle dans certains pouvoirs pathogènes.

1.2.5. Les toxines :

Après leur colonisation et multiplication, quelques espèces bactériennes ont la capacité de produire des toxines dont les effets peuvent s'exercer à distance de la porte d'entrée Les toxines bactériennes sont subdivisées en exotoxines et en endotoxines [34].

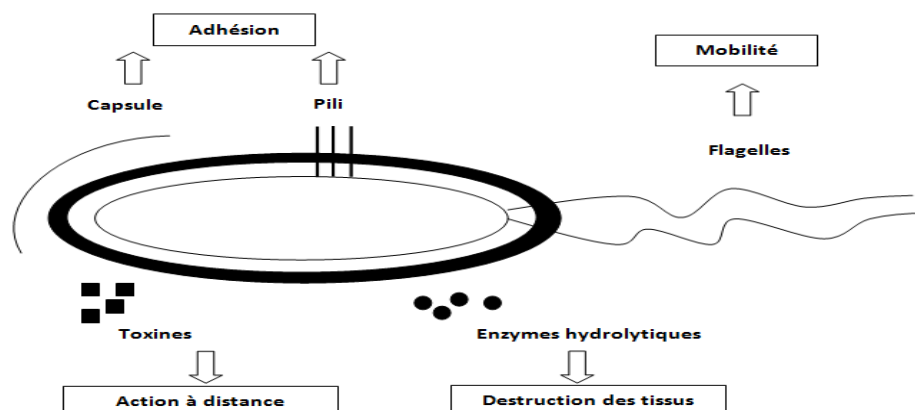
Tableau 1 : Types de toxines bactériennes.

	Endotoxines	Exotoxines
Localisation	Font partie du corps cellulaire	Libérées hors de la cellule
Type de bactéries	Bactéries à Gram négatif	Bactéries à Gram positif
Sensibilité à la chaleur	Thermostables	Thermolabiles
Pouvoir toxique	modéré	très élevé

1.2.7. Les enzymes :

De nombreuses bactéries pathogènes sécrètent des enzymes hydrolytiques permettant la destruction des tissus (hyaluronidases, protéases,etc).

Figure 2 : Rôle des composants bactériens dans le pouvoir pathogène



[Tapez un texte]

2. Les virus :

Des entités acellulaires de très petite taille de l'ordre du nanomètre. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires dont le principe est de détourner à son profit le fonctionnement d'une cellule après l'avoir parasitée. Les virus sont, généralement, constitués d'un seul acide nucléique. Ils sont classés ainsi en virus à ARN (Grippe, rubéole, rougeole, SIDA) et virus à ADN (Herpès, hépatite B, varicelle). Ils peuvent être également divisés en virus nus (à transmission interhumaine indirecte ou directe) et virus enveloppés (à transmission interhumaine directe) selon l'existence ou non d'une enveloppe qui l'entoure. [34].

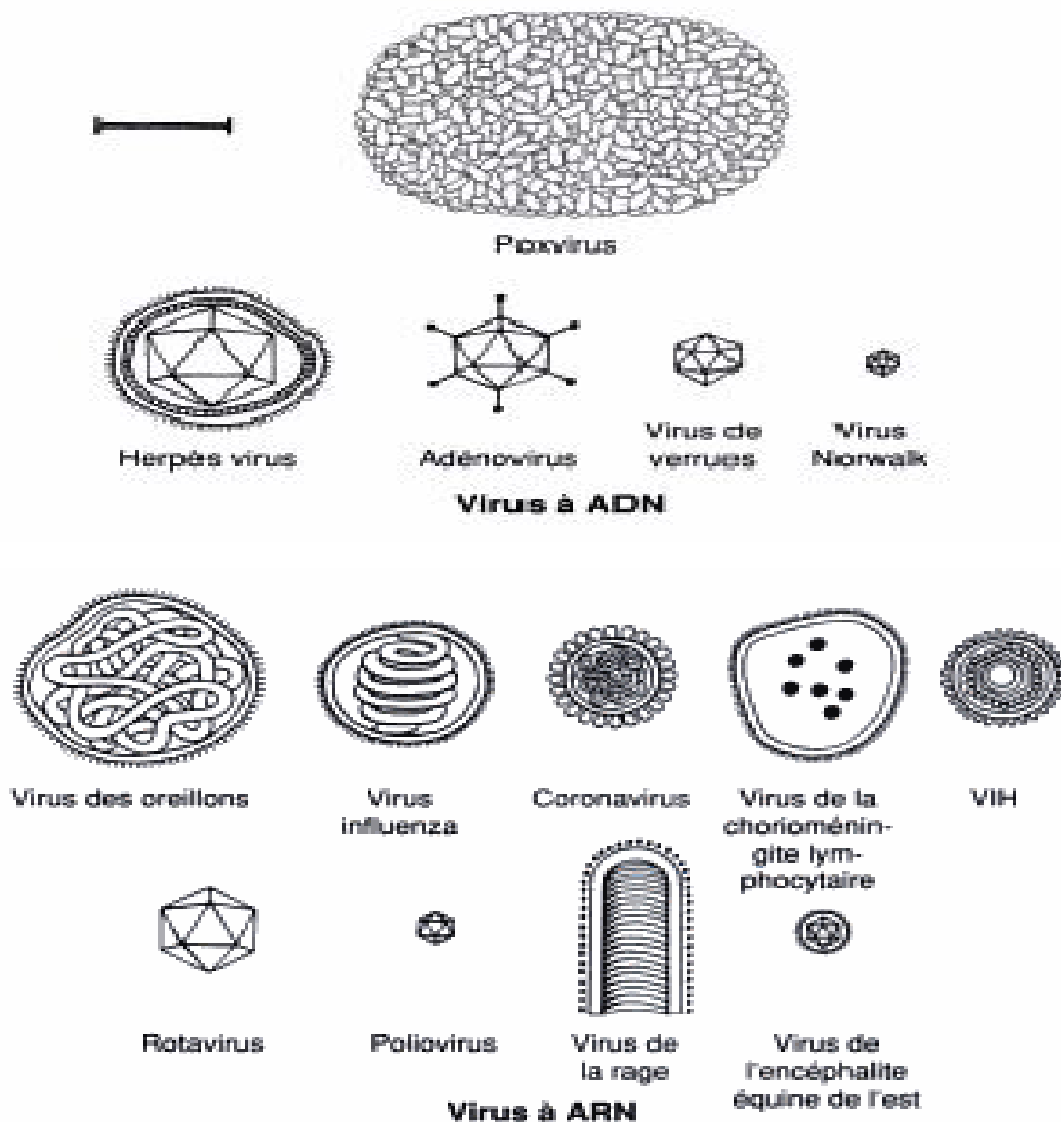


Figure 3 : Morphologie des virus.

[Tapez un texte]

Tableau 3 : Principaux virus pathogènes.

Nom du virus	Maladie	Transmission	Vaccin
Ebola	Fièvre hémorragique	Sang et liquides biologiques	Non
Herpès simplex	Lésion dermatologiques	Liquide des lésions	Non
HIV	SIDA	Sang, liquides biologiques	Non
Influenza	Grippe	Gouttelettes respiratoires et manuportée	Oui
Poliovirus	Poliomyélite	Oro-fécale	Oui
Rhinovirus	Rhume	Gouttelettes respiratoires et manuportée	Non
Rotavirus	Gastro-entérite	Oro-fécale	Non
Varicella-zoster	Varicelle, zona	Liquide des lésions	/
Virus de l'hépatite A, E	Hépatite (jaunisse et fièvre)	Oro-fécale (aliments contaminés)	Oui pour A
Virus de l'hépatite B, C, D	Hépatite (jaunisse et fièvre)	Sang, liquides biologiques	Oui pour B
Virus de la rage	Rage	Morsure d'un animal infecté	Oui
Virus de la rougeole	Rougeole	Gouttelettes respiratoires et manuportée	Oui
Virus de la rubéole	Rubéole	Personne à personne	Oui
Virus des oreillons	oreillons	Gouttelettes respiratoires et salive	Oui

3. Les parasites :

Un parasite est organisme eucaryote qui vit aux dépens d'un individu d'une autre espèce dont il altère la santé. Le parasitisme est à distinguer du commensalisme qui présente un partage d'une même source nutritive sans nuire à l'hôte, et de la symbiose qui est une association avantageant les deux partenaires.

On distingue plusieurs types de parasites :

Les protozoaires unicellulaires comme l'agent du paludisme (*Plasmodium falciparum*), l'agent de la toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*) et l'agent de l'amibiase (*Entamoeba histolytica*) ;

Les némathelminthes (vers ronds) pluricellulaires comme l'agent de la trichocéphalose (*Trichuris trichiura*), l'agent de l'ascarirose (*Ascaris lumbricoides*) et l'agent de la dracunculose (*Dracunculus medinensis*) ;

Les plathelmuinthes (vers plats) pluricellulaires comme les *Tenia* et l'*Echinococcus* ;

Les ectoparasites ou parasites de la peau et des phanères (cheveux, poils) comme le sarcopte de la gale (*Sarcoptes scabiei*), les poux (*Pediculus capitis* et *P. humanus*) et les morpions (*Phthirus pubis*).

Tableau 4 : Principales maladies parasitaires.

Maladie	Parasite
Toxoplasmose	<i>Toxoplasma gondii</i>
Paludisme (Malaria)	<i>Plasmodium</i>
Maladie du sommeil	<i>Trypanosoma brucei</i>
Maladie de Chagas	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Leishmaniose	<i>Leishmania</i>
Amibiase	<i>Entamoeba histolytica</i>
Giardiose	<i>Giardia intestinalis</i>
Distomatose	<i>Douves</i>

4. Les champignons :

Les champignons microscopiques (ou mycètes) sont des organismes eucaryotes. Ils se répartissent en deux grands groupes : les levures et les moisissures.

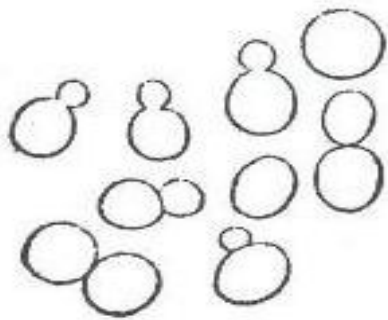
Les levures sont unicellulaires, non filamenteux. Elles ont une taille très variable, selon les espèces. Elles ont des formes plus ou moins sphériques ou ovoïdes (forme de citron).

Les moisissures sont pour la plupart pluricellulaires. Elles se présentent typiquement sous la forme d'un réseau de filaments ramifiés dans tous les sens, appelés hyphes. L'organisme dans son ensemble est qualifié de mycélium.

Les champignons comprennent une centaine de milliers d'espèces, réparties en levures et moisissures, essentiellement saprophytes et aux activités bénéfiques et indispensables à la préservation de l'environnement, mais certaines espèces sont pathogènes et ont pour cible principale les végétaux et seule environ une cinquantaine d'espèces sont reconnues pathogènes pour l'homme. Leur incidence reste cependant relativement faible, de même que la gravité de leurs atteintes.

Les infections fongiques sont souvent d'apparition secondaire et opportuniste, chez des individus à l'immunité déficiente. Par contre, les affections fongiques superficielles sont très répandues.

(a)



(b)

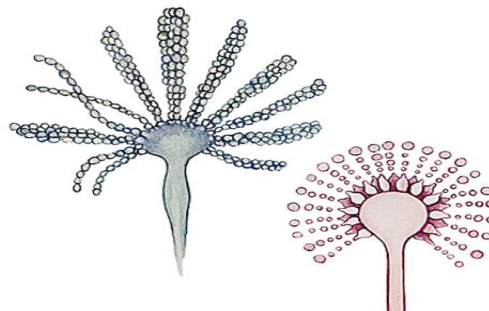


Figure 4: Structure des champignons (a), levures; (b), moisissures.

Maladie	Description
<u>Candidoses</u>	Infections opportunistes provoquées par des levures du groupe <i>Candida</i> , qui atteint essentiellement la peau et les muqueuses.
<u>Pityriasis</u>	Mycose superficielle, liée à la prolifération sur la peau d'une levure du genre <i>Malassezia</i> . Cette levure vit normalement à la surface de la peau mais dans certaines situations, elle se multiplie à grande vitesse et occasionne des petites taches brunes ou décolorées.
<u>Teignes</u>	<u>Mycose</u> provoquée par des <u>champignons</u> microscopiques attaquant le cuir chevelu. Ils peuvent être des genres <i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum</i> et <i>Epidermophyton</i> (les <u>dermatophytes</u>). La teigne se caractérise par des plaques arrondies, rougeâtres et recouvertes d'une croûte grisâtre, avec des cheveux très courts cassant à la racine.
<u>Aspergilloses</u>	Infestations causées par certaines formes de <u>champignons</u> du genre <u>Aspergillus</u> . Les plus répandues étant l'aspergillose pulmonaire.
<u>Mucormycose</u>	Cette maladie est rare mais grave, due à une contamination par des <u>champignons</u> de l'ordre des <u>Mucorales</u> , champignons filamenteux couramment présents dans l'environnement.
<u>Onychomycose</u>	Infection des <u>ongles</u> due à des <u>champignons</u> microscopiques. Les <u>dermatophytes</u> . La transmission est souvent inter-humaine.
<u>Pied d'athlète</u>	Démangeaisons entre les <u>orteils</u> . De petites peaux se détachent, la peau rougit et se crevasse.
<u>Pneumocystose</u>	<u>Pneumopathie</u> causée par le champignon <i>Pneumocystis jiroveci</i> .

Tableau 5: Les principales mycoses.

III. Réservoirs des agents infectieux :

Trois principaux réservoirs d'agents infectieux existent :

L'environnement, terre, air, eau, objets qui peuvent aussi être réservoirs d'agents pathogènes comme le *Clostridium*, les Légionnelles et *Aspergillus* ;

L'homme malade, qui constitue le principal réservoir du germe responsable de l'infection en cause (grippe, rougeole, méningite). La source de contamination dépend du lieu de vie de l'agent infectieux chez l'Homme. Ce sont surtout les produits biologiques (sécrétions oro-pharyngées émises lors de la toux, éternuements, de la parole, le sang, les matières fécales), la peau infectée (plaie, liquide de vésicules, croûtes de lésions bactériennes) et les cheveux infectés ou parasités ;

L'homme asymptomatique « ou sain », qui est porteur d'une flore commensale dont font partie certains germes pathogènes comme le staphylocoque doré et les entérobactéries [4].

VI. Modes de propagation des maladies infectieuses :

En premier lieu, l'agent infectieux doit être excrété par la personne infectée à partir d'un site tel que le nez, la bouche, ou les selles et rarement les urines. L'excrétion ne se produit pas à travers la peau (sauf en cas de furoncles, d'impétigo ou de la varicelle). Certains parasites (poux, gale) ne sont pas excrétés, mais se transmettent directement de personne à personne. Le transfert de l'agent pathogène peut se faire par l'air (gouttelettes aérosol), par contact direct (par les mains), par les aliments et l'eau, ou par l'intermédiaire d'une surface (poignées de porte, jouets, sols). Enfin, l'agent infectieux doit atteindre un site susceptible d'être infecté (en général les muqueuses : la bouche, le nez ou un œil). Un agent infectieux sur la peau d'une personne saine n'infecte pas cette personne, à moins qu'il ne soit inoculé sur une muqueuse susceptible (Tab. 1) [15].

Tableau 6: Etapes nécessaires à la transmission d'un agent infectieux.

Etapes	Conditions
Excrétion	l'agent infectieux doit être excrété par la personne infectée
Transfert	l'agent infectieux doit être transféré à la personne saine
Inoculations	l'agent infectieux doit atteindre un site susceptible chez la personne saine

V. Techniques d'études des agents infectieux :

Les études qualitatives et quantitatives, ainsi que la manipulation même des microorganismes, font appel à des techniques de laboratoire particulières, diversifiées et rigoureuses. Leur mise en œuvre dépend autant de la nature de l'échantillon que des objets recherchés.

1. La culture :

Qualifie une culture de [microbes](#) sur un milieu de culture, souvent pour l'étude de [bactéries](#). Il peut y avoir [ensemencement](#) et ou repiquage d'une culture microbienne afin de maintenir une [souche](#) de culture.

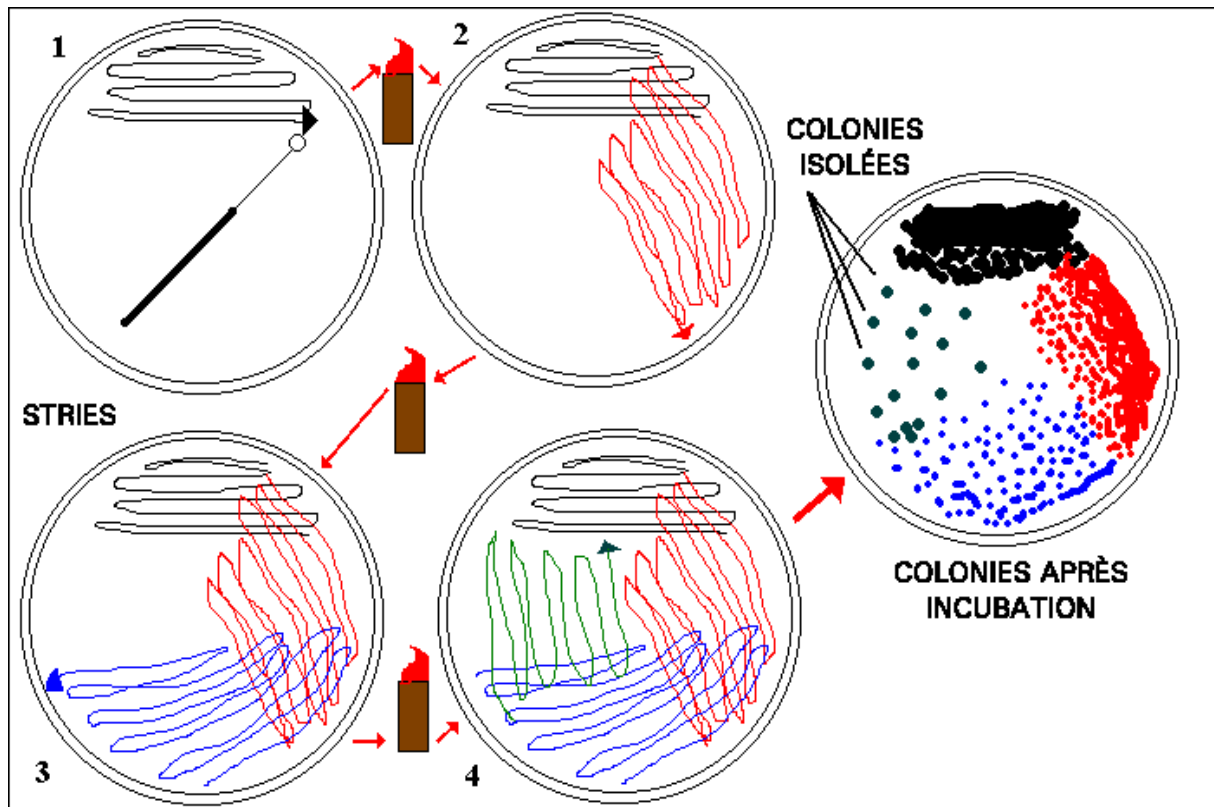
Les techniques de culture sont nombreuses ; elles varient en fonction de la nature du prélèvement (surfaces, sécrétions, selles, organes), des buts de l'étude (identification, dénombrement) et des moyens à disposition du chercheur. Parmi les techniques fréquemment employées, on trouve l'ensemencement d'une souche en boîte de Pétri, tube à essai, ou galerie. Il s'agit de placer des bactéries à la surface ou à l'intérieur de géloses. Ces dernières contiennent des éléments nécessaires à la croissance bactérienne, mais aussi, parfois, des produits inhibiteurs. On place les cultures microbiennes à une température favorable (en général 37°C) pendant environ une journée (24 heures) [39].

2. L'isolement :

L'isolement est une technique qui permet de séparer les bactéries d'un échantillon. Il permet d'obtenir des colonies différentes, espacées les unes des autres. Il consiste à étaler, à l'aide d'une anse de platine, un inoculum sur la surface d'un milieu gélosé par la méthode d'épuisement par stries. Au fur et à mesure que se prolonge la traînée, la probabilité qu'une cellule à la fois soit déposée sur la gélose augmente.

La méthode des cadrans est la plus classique. Elle consiste à diviser une boîte de Pétri en deux (50 / 50), puis de diviser de nouveau par deux une moitié afin d'obtenir trois cadrans de 50, 25 et 25. Sur le plus grand cadran une petite quantité d'inoculum est posée puis étalée. Ensuite on retourne la boîte afin d'étaler les bactéries sur un cadran plus petit, puis on retourne afin d'ensemencer le dernier petit cadran. Les stries doivent être serrées et la pipette ou l'anse de platine doit être flambée entre chaque cadran pour de meilleurs résultats. Il est aussi recommandé de ne pas passer deux fois au même endroit et de ne pas trop revenir "en arrière" lorsque l'on fait pivoter la boîte, sinon l'anse risque de se surcharger et l'isolement sera moins réussi (Fig.5) [39].

Figure 5 : Ensemencement par la technique des cadrans.



3. L'identification :

Elle consiste à assimiler une souche inconnue à une espèce déjà définie et répertoriée, par l'analyse comparative de leurs caractères. L'identification se fait nécessairement sur une culture pure (clone). Cette condition est indispensable pour éliminer la présence de toute contamination qui fausserait l'analyse [40].

3.1. Identification phénotypique et morphologique :

L'analyse préliminaire dans l'identification microbienne se fait souvent avec une ou plusieurs méthodes phénotypiques. Les méthodes phénotypiques conviennent aux micro-organismes qui sont cultivables (qui peuvent croître en culture pure sur un milieu artificiel) et qui ont des paramètres de croissance, ainsi qu'un profil physiologique et biochimique bien établis. Ces techniques utilisent les colonies et la morphologie des cellules afin d'obtenir une identification initiale du micro-organisme. On y parvient en isolant simplement le micro-organisme, en le cultivant et par la suite en l'observant visuellement à l'aide d'un microscope. Les propriétés morphologiques comprennent la forme, la taille, les caractéristiques superficielles et la pigmentation, les caractéristiques des parois cellulaires (coloration de Gram) et les caractéristiques de sporulation.

3. 2. . Identification biochimique, physiologique et métabolique :

Les méthodes d'identification phénotypiques comprennent l'étude du profil biochimique et des propriétés métaboliques d'un micro-organisme par l'entremise de test sur ses conditions de croissance, sur ses activités enzymatiques et sur la composition de ses cellules en acides gras.

Les tests biochimiques utilisent des milieux de croissance, des éléments nutritifs, des produits chimiques ou des conditions de croissance spécifiques pour provoquer une réponse biochimique observable et mesurable chez le micro-organisme, ce qui permet du même coup son identification et sa caractérisation. Ces tests comprennent : l'utilisation de sources de carbone et d'azote, différentes conditions de croissance (anaérobie ou aérobie, température optimale et intervalle de températures, pH optimal et intervalle de pH), des conditions osmotiques préférentielles, la production de produits de fermentation, la production d'enzymes, la production de composés antimicrobiens, de même que la sensibilité aux inhibiteurs métaboliques et aux antibiotiques. Parmi les tests reconnus, on retrouve : le test au rouge de phénol et carbohydrate, les tests de catalase et d'oxydase, les tests d'oxydation / fermentation, les tests au rouge de méthyle, les tests de Voges-Proskauer, la réduction des nitrates, l'hydrolyse de l'amidon, l'hydrolyse du tryptophane, la production de sulfure d'hydrogène, l'utilisation du citrate, etc. Plusieurs systèmes commerciaux miniaturisés et automatisés sont actuellement offerts et sont assortis de procédures de contrôle de la qualité bien définies qui permettent l'identification rapide des micro-organismes [40].

I. Historique

C'est après la seconde Guerre Mondiale qu'on a assisté à l'écllosion de crèches pour les familles de travailleurs. La crèche devient par la suite une réponse nécessaire à l'évolution du statut de la femme qui travaille. Ce sont en quelque sorte des «garderies médicales» où l'hygiène est l'objectif principal [16].

Les crèches font réellement leur apparition avec l'ère industrielle. La première crèche du monde a été née en 1770 en France, plus précisément dans les Vosges. Une autre «crèche charitable» a été ouverte en 1844 dans le quartier de Chaillot à Paris, suite à l'apparition d'une loi qui interdit le travail des enfants et empêche les mères de les emmener au lieu de travail (1841) [18].

A cette époque, ces établissements d'accueil avaient principalement pour mission de favoriser le travail des femmes permettant ainsi de stabiliser la main-d'œuvre féminine. L'épanouissement et la psychologie de l'enfant n'était pas présente au sein d'une crèche [17].

II. Définition

Une crèche est un lieu d'accueil collectif destiné aux enfants n'ayant pas l'âge d'aller à l'école. Généralement, des enfants de deux mois à trois ans. Ces enfants sont accueillis par un personnel qualifié.

La crèche a pour rôle de pallier au mieux l'absence des parents, mais sans s'y substituer. Il s'agit également d'un lieu permettant à l'enfant de découvrir la vie en société et dont l'équipe d'encadrement et d'animation (éducateurs, assistantes maternelles, puéricultrices, psychologues, ...) s'appuie sur un [projet éducatif](#) [8, 9, 12].

Les crèches sont placées sous le contrôle du Conseil général du département dont elles dépendent et ont pour obligation de veiller à la santé, à la sécurité, au bien-être et au développement des enfants qui leur sont confiés [1, 10].

L'ouverture de garderies et autres crèches est soumise à des normes. Cependant, dans la réalité, beaucoup de centres d'accueil de la petite enfance ne les respectent pas. C'est tout simplement devenu un commerce en constante augmentation et dont les gérants profitent de la détresse des familles pour accueillir les enfants parfois dans des conditions pas toujours convenables [2].

On appelle «micro-crèche» une structure pouvant accueillir une dizaine d'enfants, au maximum, d'âges différents. Les locaux, contrôlés et aux normes en vigueur, sont conformes et aménagés dans l'intérêt de l'enfant, les horaires, contrairement aux structures collectives sont souples et adaptés aux parents et le personnel encadrant doit être composé au moins de trois professionnels diplômés ainsi que d'une directrice d'établissement à temps partiel [3].

III. Aménagement

Les crèches sont divisées en multiples espaces différenciés selon les types d'activités effectuées et l'âge des enfants (Fig. 1). Elles comprennent, généralement, un coin pour les jeux, un coin pour la lecture, un espace réservé aux bébés, une salle d'activités manuelles et psychomotrices pour les plus grands, des

dortoirs permettant de respecter les besoins en sommeil et les habitudes des enfants, une salle de change qui permet de pouvoir changer les enfants en toute sécurité sur un plan adapté, un cabinet de toilette, des lave-mains et des pots pour les enfants en cours d'apprentissage de la propreté, une cuisine et une salle à manger aménagées de façon à pouvoir confectionner les repas sur place, un espace plein air permettant aux enfants de jouer dehors et toujours sous surveillance de l'adulte et enfin, un bureau de direction pour la gestion de la crèche, l'accueil confidentiel des parents, le suivi des dossiers et la comptabilité [21].

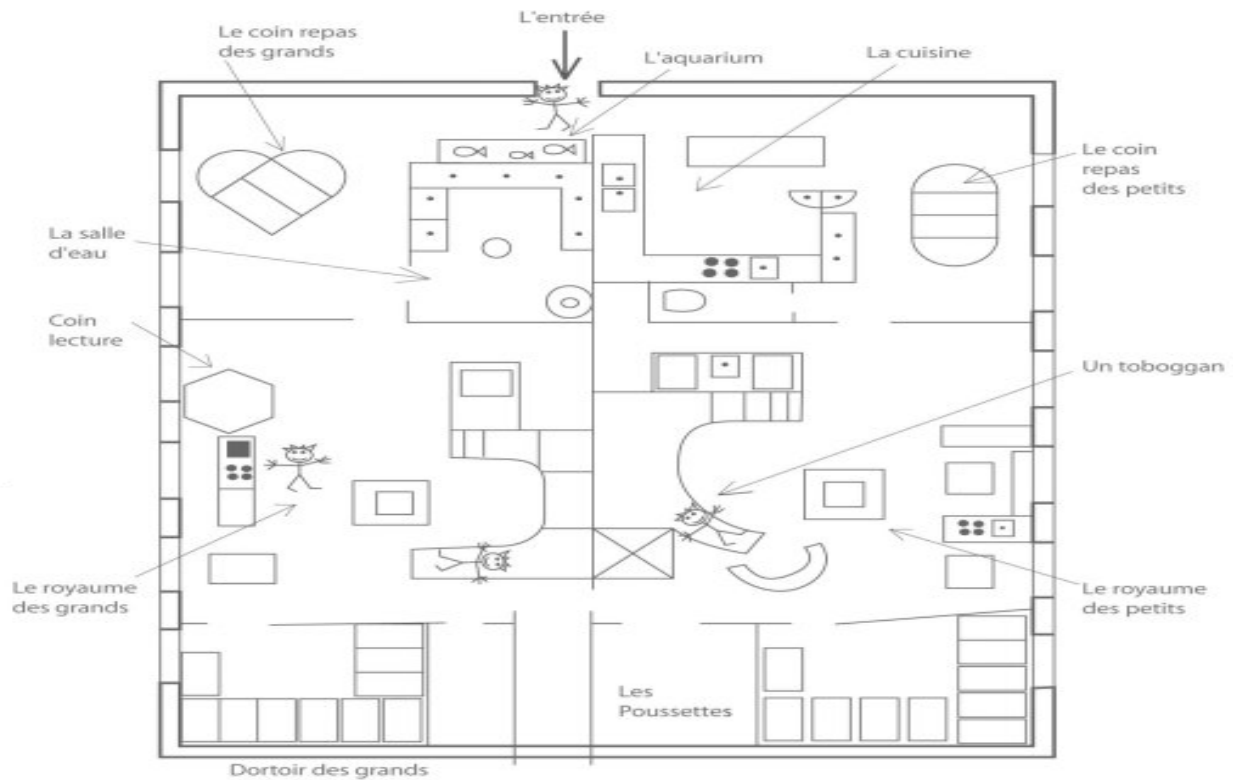


Figure 6 : Modèle d'un plan d'une crèche.

IV. Types de crèches :

1. Crèches collectives :

Les crèches collectives accueillent les enfants de 2 mois et demi à 3 ans. Elles sont gérées par une directrice, qui a un diplôme de puéricultrice, et toute une équipe spécialisée y travaille, des auxiliaires de puériculture, des éducatrices de jeunes enfants, etc. Les crèches collectives doivent être rattachées à un pédiatre qui vient faire des visites [7].

L'avantage de ces crèches est qu'elles socialisent votre enfant, en lui faisant connaître la vie de groupe. Il y a aussi de nombreuses activités destinées à l'éveil de votre bébé. Les inconvénients sont les risques de contagion, c'est pourquoi beaucoup de parents sont embarrassés, car si votre bébé est malade, il risque d'y être refusé.

2. Crèches parentales :

Elles sont gérées par une association de parents. Votre enfant est accueilli dans des locaux spécifiques par des parents, qui sont assistés par des professionnels comme par exemple les auxiliaires de puériculture. Chaque parent d'enfant inscrit doit participer au minimum une demi-journée voir une journée par semaine. C'est un système qui semble convenir parfaitement aux parents qui travaillent à temps partiel [3].

3. Crèches familiales :

Cette fois-ci votre bébé est gardé par une assistante maternelle agréée par la Protection Maternelle et Infantile (PMI) à son domicile. Elle est encadrée par une directrice de crèche, qui est aussi puéricultrice : elle vient de temps en temps au domicile vérifier que tout se passe bien. L'assistante maternelle se rend une ou deux fois par semaine à la crèche collective dont elle dépend, pour que les enfants aient des activités en collectivité.

L'avantage de ce mode de garde est la personnalisation des soins, puisqu'une assistante maternelle ne peut accueillir plus de trois enfants, y compris les siens. En plus, les horaires peuvent être fixés en s'accordant, et si votre bébé est malade, il ne sera pas systématiquement rejeté comme dans les crèches collectives [7].

4. Crèches d'entreprise :

Peu répandues, elles commencent néanmoins à se développer dans les grandes entreprises. Elles offrent les mêmes prestations que les crèches collectives, sauf que les personnes qui la gardent sont eux aussi employés de l'entreprise.

Elles se situent dans l'enceinte même de l'entreprise ou aux alentours. Le grand avantage est la sérénité dont font preuve les mamans qui ont recours à ce système : pas de trajet domicile-crèche, crèche-travail, et rien que de savoir que son petit bout est à quelques minutes est d'un grand réconfort [7].

V. Réglementation :

Les crèches sont régies par les règles d'encadrement de la Protection Maternelle Infantile (PMI) et du Ministère de la Solidarité Nationale et de la Famille. Pour créer une crèche, plusieurs critères et conditions sont à respecter :

Le responsable du projet doit être titulaire d'un diplôme et de qualifications en rapport avec l'objet de l'établissement et il doit jouir de tous ses droits civiques et civils ;

Le local de la crèche doit être aménagé selon les normes et éloigné des différentes nuisances susceptibles de porter atteinte à la sécurité et à la santé physique et mentale des enfants ;

Un rapport annuel des activités doit être adressé au Ministre chargé de la Solidarité Nationale, au Wali et à la direction de la wilaya chargée de l'action sociale ;

La capacité d'accueil de l'établissement ne doit pas dépasser le nombre d'enfants accueillis mentionné sur l'arrêté d'autorisation délivré par le wali ;

Les enfants sont pris en charge par une équipe de professionnels de la petite enfance, à raison d'une personne pour cinq enfants non marchands et d'une personne pour douze enfants marchant. D'autres professionnels (psychologues, psychomotriciens, intervenants culturels, etc.) peuvent intervenir dans cette équipe sur des temps réduits ;

Les enfants atteints d'une pathologie contagieuse, nécessitant une éviction et ceux dont l'état nécessite une surveillance ou des conditions de confort particulières, ne peuvent pas être accueillis [29, 30].

VI. Risques infectieux liés aux crèches :

Les écoles, les crèches et les autres collectivités d'enfants, mettant en contact de nombreux individus dans un espace relativement restreint, favorisent la transmission des agents infectieux.

À la crèche, les enfants jouent ensemble, partagent leurs jouets, s'échangent leurs tétines, toussent, éternuent. Tous ces actes, liés à la petite enfance, augmentent la propagation rapide des germes. Les enfants de moins de deux ans constituent le groupe à plus haut risque car ils explorent l'environnement avec la bouche et ils n'ont pas le contrôle des urines et des selles [32].

Puisque beaucoup d'agents infectieux se transmettent par l'intermédiaire d'objets, de surfaces et d'aliments contaminés, le manque de vigilance dans l'application des mesures d'hygiène est l'un des facteurs les plus importants favorisant la dissémination des maladies contagieuses dans ce genre d'établissements.

Toutes ces facteurs expliquent l'incidence des maladies infectieuses notamment les infections féco-orales, respiratoires, digestives et cutanées chez les enfants fréquentant les crèches collectives (Fig. 2) [13].

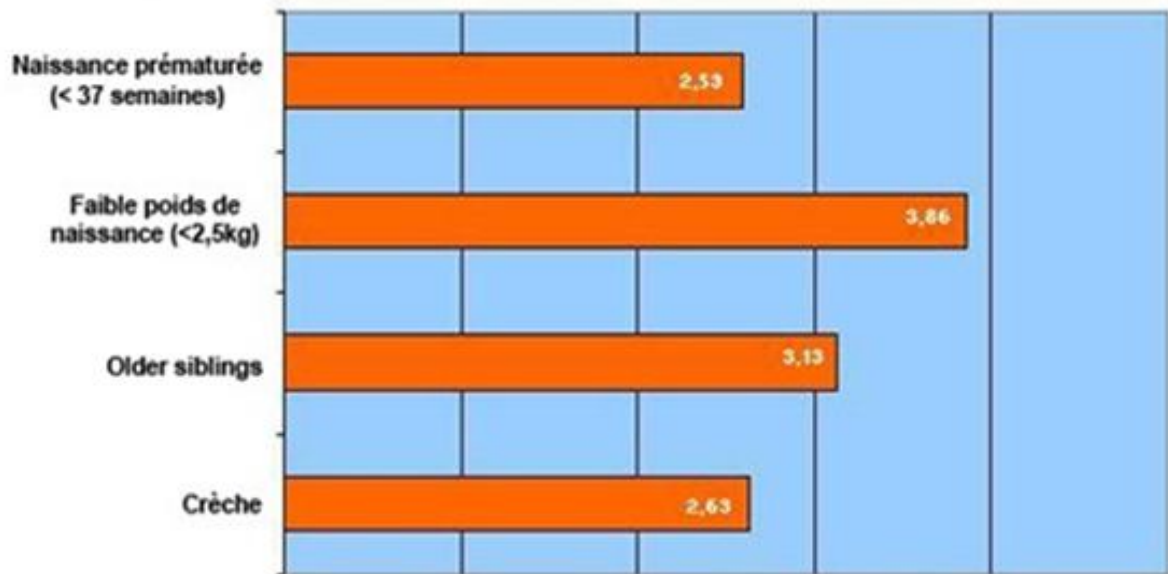


Figure 7 : Facteurs de risque des infections invasives à pneumocoques (IPD) chez les enfants de moins de six mois [24].

Groupe	Pourcentage de S.pneumoniae colonisation
Enfant en âge préscolaire	38-45
Enfant fréquentant l'école élémentaire	29-35
Adolescents fréquentant de lycée	9-25
Adulte ayant des enfants a la maison	18-29
Adultes sans enfants à la maison	6

Tableau 7: probabilité de la colonisation par S.pneumoniae

VII. Principaux germes rencontrés en crèches :

La transmission des maladies infectieuses en collectivité peut être causée par plusieurs agents microbiens tels que les bactéries, les virus et les parasites.

Dans une étude sur les épidémies entériques dans les crèches, *Escherichia coli* fut identifiée comme le pathogène le plus courant responsable de maladies graves nécessitant une hospitalisation [27].

Le staph doré ou *Staphylococcus aureus*, responsable le plus souvent des infections cutanées localisées comme l'impétigo, les boutons et les abcès, a été souvent rencontré dans les crèches.

Au début des années 1990, une étude réalisée par le laboratoire d'hygiène de la ville de Paris a permis de caractériser la qualité microbiologique de l'air à l'intérieur de dix établissements scolaires. L'évaluation de la contamination aérienne, par comptage des bactéries mésophiles totaux, a révélé la présence d'une flore bactérienne qui se varie entre 200 et 19 500 CFU/m³. *Staphylococcus aureus* a été identifié dans 32,7 % des échantillons. Les entérobactéries et les streptocoques thermotolérants

(indicateurs d'une contamination fécale ou hydrotellurique) ont été retrouvés dans 6,2 et 50.6 % des prélèvements respectivement. Parmi les entérobactéries isolées, on note la présence d'*Enterobacter cloacae* en première position suivi par le genre *Pseudomonas* (bacille non fermentaire) en deuxième position.

[37].

D'autre part, il a été prouvé que la transmission de l'agent de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, au sein des collectivités est généralement due à la contagiosité d'un adulte atteint de la maladie. L'enfant est rarement, sinon jamais, contagieux du fait de la concentration très faible de Bacille de Koch (BK) dans ses sécrétions bronchiques et de l'absence d'une toux significative [32].

Au cours des épidémies annuelles, le rassemblement d'enfants sensibles et non vaccinés dans les écoles et les crèches fournit un terrain idéal à la transmission des infections oto-rhino-laryngées (ORL) et pulmonaires, d'origine virale (grippe, rhume, rhinite, oreillons) ou bactérienne (pneumonies, coqueluche). Elles sont particulièrement contagieuses et se transmettent par les sécrétions nasales, salivaires ou bronchiques [20, 25, 26].

Il est également à noter que les formes *asymptomatiques* de l'hépatite A, chez l'enfant de moins de deux ans, sont très fréquentes.

La phtiriose (*Pediculus capitis*), la gale (*Sarcoptes scabiei*), les teignes, présentent les affections parasitaires les plus communes que l'on observe le plus fréquemment chez les enfants d'âge scolaire ou préscolaire. Les enfants qui en sont atteints doivent être exclus de l'établissement et ne peuvent être admis à nouveau qu'après une guérison complète [32].

VIII. Prévention :

L'application des règles d'hygiène garde une place essentielle pour prévenir les maladies transmissibles en collectivité, en luttant contre les sources de contamination et en réduisant les moyens de transmission. En cas de maladie infectieuse dans sa structure, il est important que le responsable soit informé afin de renforcer les mesures courantes d'hygiène, le personnel et les parents doivent être également sensibilisés à cette éventualité. En effet, une bonne circulation de l'information contribue à limiter le risque de contagion pour l'ensemble de la collectivité.

Les mesures d'hygiène doivent être appliquées au quotidien comme le nettoyage des matériels et des surfaces lavables en insistant sur les surfaces et les objets les plus souvent touchés (sol, tables, poignées de porte, jouets, etc).

Un lavage régulier des mains des enfants doit être pratiqué avant chaque repas, après que l'enfant soit allé aux toilettes ou après que l'enfant ait manipulé des objets possiblement contaminés (terre, animal...).

L'utilisation des savons liquides et des solutions hydro-alcooliques, l'usage des serviettes en papier jetables, le respect des règles d'hygiène alimentaire dans la préparation et la distribution des repas, le

vidage quotidien des poubelles et le changement du linge dès que nécessaire sont très recommandés dans ce genre d'établissements.

Enfin, la vaccination constitue un des moyens essentiels de prévention des maladies infectieuses et virales. Correctement effectués, les vaccins évitent non seulement les maladies individuelles mais aussi les épidémies et permettent même d'envisager la disparition de certaines maladies [5, 6, 11, 20].

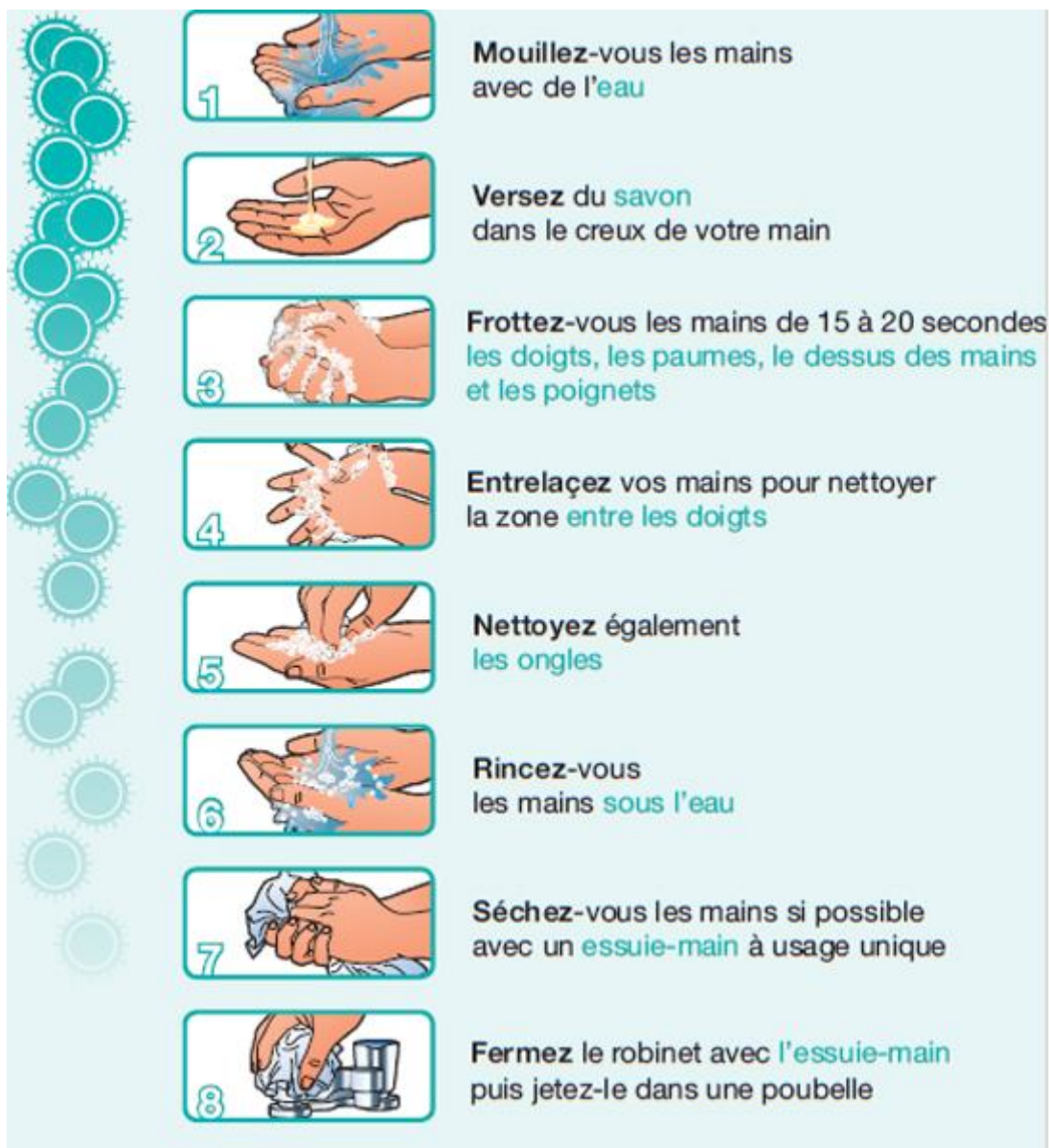


Figure 8: étapes sur lavage des mains sur les normes.

Tableau 8 : le calendrier de vaccination recommandé par l'OMS [5].

Age	Vaccination
1 mois	BCG
2 mois	DTCPH (Diphtérie, Tétanos, Coqueluche, Poliomyélite, Haemophilus) Hépatite B
3 mois	2e injection de DTCPH
4 mois	3e injection de DTCPH Hépatite B
12-15 mois	ROR (Rougeole, Oreillons et Rubéole) Hépatite B
16-18 mois	1e rappel de DTCPH
3a 6 ans	ROR 2e dose
A 6ans	2e rappel DTP (Diphtérie, Tétanos, Poliomyélite) ROR : vaccination de rattrapage pour les enfants n'ayant pas été vaccinés plus tôt BCG si la vaccination n'a pas été faite durant l'enfance



MATERIEL

&

METHODES

1. Cadre de travail :

L'objectif de notre travail est l'isolement et l'identification des bactéries pathogènes provenant des crèches des enfants afin de vérifier le niveau d'hygiène dans ces endroits qui peuvent être la cause de la propagation de plusieurs germes.

Notre travail a porté sur deux crèches qui se trouvent dans le centre de la ville de Khenchela. Il s'agit de la crèche le paradis des enfants et la crèche Theldja et El- Akzam. (Tab 09).

Toutes nos analyses bactériologiques ont été effectuées au niveau du laboratoire de bactériologie de l'établissement public hospitalier (EPH) 120 lits de Khenchela.

Tableau 09 : des deux crèches.

	Crèche I	Crèche II
Structure	<ul style="list-style-type: none">- Le bureau de la directrice- Une chambre pour les nourrissons (3 mois - 2 ans)- Une chambre pour les enfants entre 2 et 3ans- Une chambre pour les enfants entre 4 et 6 ans- Une cuisine- Le sanitaire	<ul style="list-style-type: none">- Le bureau de la directrice- Une chambre pour les nourrissons (3 mois - 3ans)- Une chambre pour les enfants entre 4 et 5 ans- Un jardin- Une cuisine- Le sanitaire
Effectif d'enfants	50	70
Tranches d'âge	3 mois à 6 ans	3 mois à 5 ans
Encadrement	<ul style="list-style-type: none">- Directrice- Trois éducatrices	<ul style="list-style-type: none">- Directrice-Femme de ménage- Six éducatrices

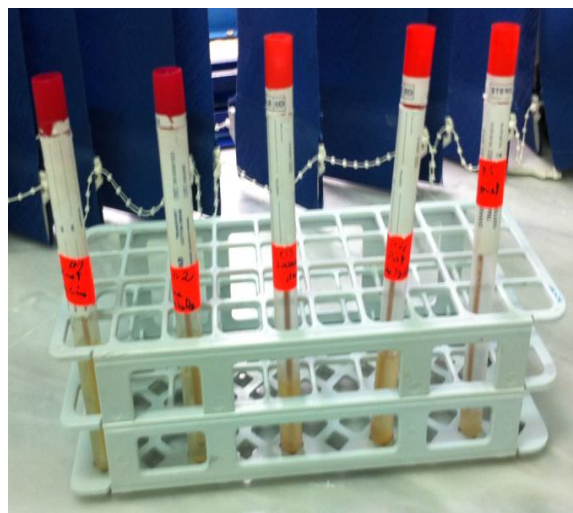
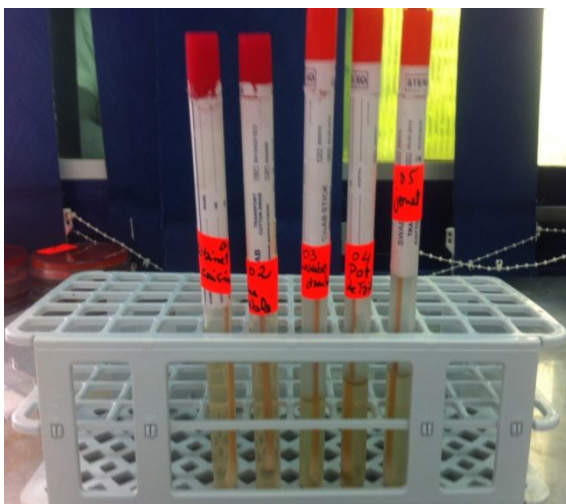
2. Échantillonnage :

Les échantillons ont été prélevés à partir de plusieurs endroits déterminés selon le tableau suivant (Tab 10) (Photo 01)

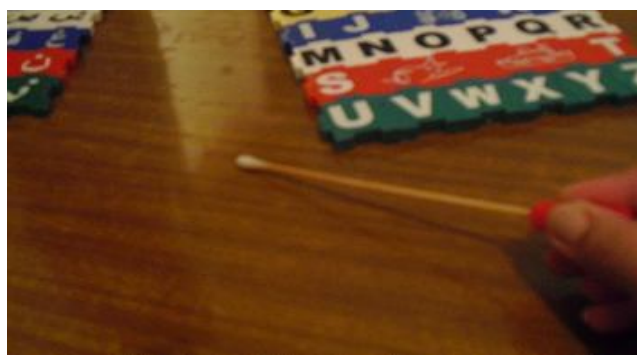
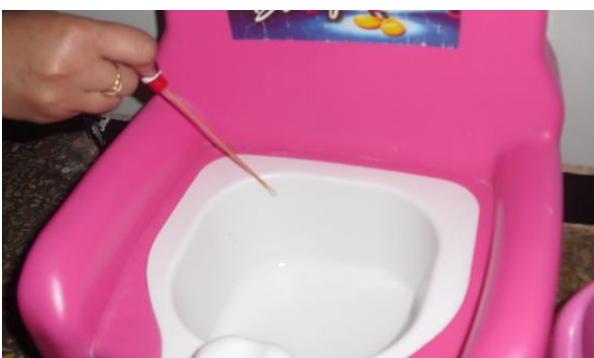
Tableau 10: Sites des prélèvements dans les deux crèches.

		Points de prélèvement
Crèche I	P 1	Robinet de cuisine
	P 2	Table de lecture des enfants
	P 3	Lavabo de douche
	P 4	Pot de toilette
	P 5	Jouets
Crèche II	P 1	Robinet de lavabo de douche
	P 2	Pot de toilette
	P 3	Jouets
	P 4	Table de lecture des enfants
	P 5	Robinet de cuisine

Les prélèvements ont été réalisés durant le moi de mai 2014 à l'aide d'écouvillons stériles, étiquetés (la date, heure, site de prélèvement) et humidifiés avec un bouillon nutritif, par frottement direct des tiges des écouvillons sur les surfaces à analyser. (Photo 09). Les écouvillons sont ensuite acheminés au laboratoire dans un délai qui n'a pas dépassé trois heures.



Photographie 01 : Ecouvillons des prélèvements.



Photographies 02 : Points de prélèvements (crèche I à gauche ; crèche II à droite).

3. Enrichissement et Isolement :

Après 24 heures d'enrichissement, nous avonsensemencé quatre milieux de culture gélosés afin d'isoler le maximum des bactéries présentes. L'ensemencement a été effectuée par stries transversales (Fig. 09) sur les surfaces de boîtes de Pétri contenant : la gélose nutritive, la gélose au sang, une gélose Chapman et une gélose Hektoen. Les boîtes sont ensuite marquées puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

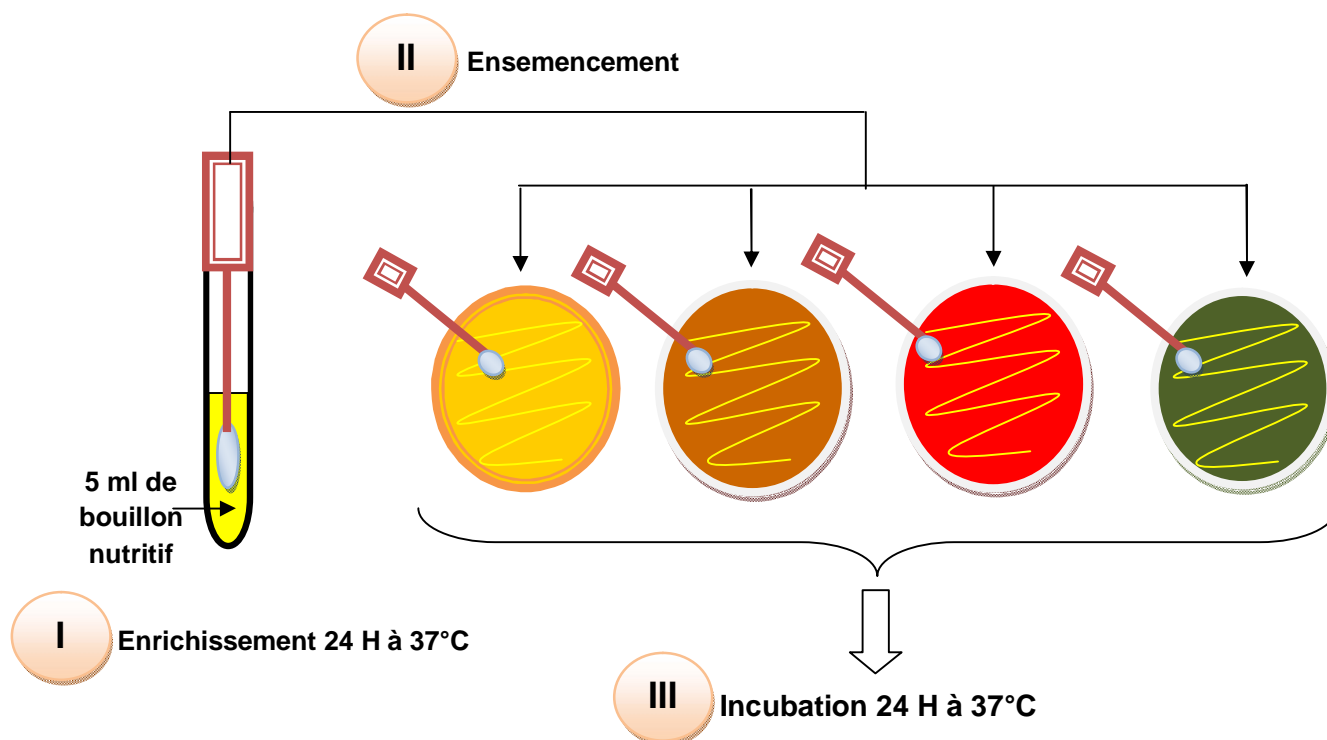


Figure 09 : Technique d'ensemencement sur les quatre milieux gélosés.

3. 1. Gélose nutritive :

La gélose nutritive (GN) ou gélose ordinaire est un milieu non-sélectif utilisé dans le cadre de la microbiologie pour la culture d'une grande variété de bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Il est généralement utilisé pour contrôler la pureté d'une souche bactérienne ou de purifier la souche bactérienne si elle est contaminée.

3.2. Gélose au sang :

C'est un milieu d'isolement additionné de sang stérile enrichi préconisé pour l'étude des bactéries dites exigeantes. Il permet également l'observation d'une hémolyse éventuelle, **qui est un critère d'orientation, en particulier pour les streptocoques. On distingue deux types d'hémolyse** : l'hémolyse β qui se traduit par une zone claire d'hémolyse totale de diamètre 3-4 mm entourant les

colonies et l'hémolyse α qui se traduit par une zone floue et granuleuse, verdâtre de 1 à 2 mm de diamètre). (22).

3.3. Gélose Hektoen :

Milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries (bacilles à Gram négatif) pathogènes. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies. Les colonies sur Hektoen peuvent avoir une couleur saumon (*Escherichia*, *Levinea*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Yersinia*), saumon à centre noir (*Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*), bleu-vert à centre noir (Suspicion de *Shigella* ou de *Salmonella*). (22)

3.4. Gélose Chapman :

Milieu sélectif pour l'isolement et la numération des staphylocoques. Il permet également de différencier les espèces fermentant le mannitol de celles qui ne le fermentent pas. S'il y a fermentation, cela induit une acidification qui entraîne une coloration jaune du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur de pH). En plus des staphylocoques, on peut également cultiver sur ce milieu les *Micrococcaceae* et quelques autres Gram positifs comme les *Bacillus* et l'*Enterococcus*. (22)

4. Identification :

4.1. Caractères macroscopiques :

La première étape du diagnostic bactérien d'une souche est la description macroscopique des colonies isolées; parfois cette seule étude permet de connaître le germe qu'on a en présence car les colonies sont typiques.

Plusieurs caractères sont à noter comme, la taille, la forme, le contour le relief, la couleur, ... Etc. De nombreux autres caractères pourraient être décrits. En effet, il arrive que l'opacité, la consistance ou l'odeur soient significatives d'une espèce bactérienne.

Il existe trois grands types de colonies :

- Colonies de type E S (Smooth = lisse): contours lisse et réguliers, semi-bombée, surface brillantes, crémeuses ;
- Colonies de type M (Muqueux): contours lisse et réguliers, très bombées, surface très brillantes, filantes ;
- Colonies de type R (Rough = rugueux) : contours irréguliers, plates rugueuses et mates, sèches.

4.2. Caractères microscopiques :

4.2.1. Etat frais :

L'état frais se fera avec une suspension de colonie qui ne sera pas fixée sur la lame comme la coloration de Gram mais se fera avec une goutte de suspension entre lame et lamelle. Cette observation microscopique se fera à l'objectif x 40 avec peu de lumière pour ne pas tuer les bactéries car le but de cette observation est de maître en évidence leurs mobilité surtout.

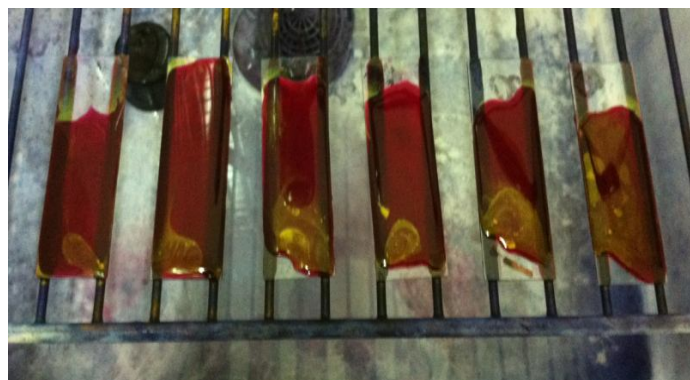
4.2.2. Coloration de Gram :

C'est un procédé qui permet de diviser les bactéries en deux groupes distincts : les bactéries à coloration de Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative. Cette coloration permet en plus de préciser la morphologie et le mode de regroupement des cellules.

Les frottis préparés sont colorés avec une solution de violet de Gentiane, qui est un colorant basique, pendant une minute. Ensuite les lames sont rincées par une solution iodo-iodurée (de lugol) qui agit comme un mordant en augmentant les interactions entre le colorant et les cellules afin que ses dernières soient contrastées. Sans rincer et en inclinant les lames à 45 degré, les frottis sont décolorés par lavage avec un mélange d'éthanol et d'acétone. Cette dernière étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de Gram.

Les bactéries de coloration positive gardent le violet de Gentiane tandis que les autres le perdent et se décolorent. Juste après la coloration est arrêtée par lavage à l'eau du robinet. Finalement les frottis seront recolorés au moyen d'un colorant basique de couleur rose (la fuchsine de ziehl) diluée pendant 15 secondes puis rincer abondamment à l'eau du robinet.

Une fois séchés, les lames sont examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif à immersion (x100). (19)



Photographie 03: Etat frais et coloration de Gram des isolats sélectionnés.

4.3. Caractères biochimiques :

4.3.1. Test de la catalase :

Pendant leur respiration aérobie, certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce à des enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase.

Sur une lame de verre propre, déposer une goutte de H₂O₂, puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement avec une pipette pasteur boutonnée. Si formation de bulles, la bactérie possède la catalase. Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

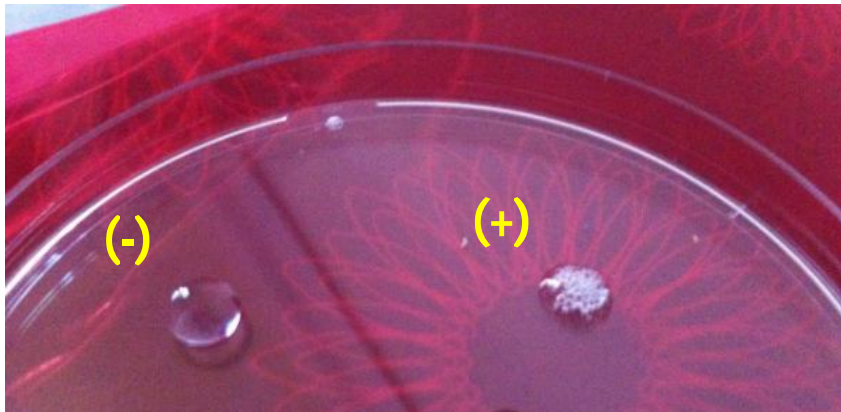


Photo. 04 : Test de la catalase.

4.3.2. Test de la coagulase :

La coagulase est une [enzyme](#) capable de faire coaguler le [plasma sanguin](#). C'est un test utilisé pour l'identification de *Staphylococcus aureus*.

Dans un tube à hémolyse stérile, on met en contact 0,5 ml du plasma de lapin oxalaté avec 0,5 ml de bouillon cœur-cerveau. On homogénéise le tout puis on incube à 37 °C pendant 2 heures. Si le plasma coagule (pas d'écoulement), le germe possède une coagulase. S'il reste liquide la souche est coagulase négatif.



Figure 10 : Test de la coagulase.

4.3.3. Galerie biochimique :

La galerie Api 20E (BioMérieux) est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés. Elle est constituée de 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de la fermentation de sucres. La suspension bactérienne répartie dans les tubes dissout les substrats. Les métabolites produits au cours des 24 heures d'incubation sont mis en évidence par des réactions colores spontanées ou révélées par l'addition de réactifs.





Photographie 05 : Préparation des galeries Api 20E.

- **Recherche de la β -galactosidase :**

Le test consiste à incuber la souche bactérienne en présence de l'orthonitrophényl- β -galactoside (ONPG). L'apparition d'une couleur jaune (ONP) indique la présence de la β -galactosidase.

- **Recherche de l'arginine-dihydrolase (ADH) :**

Le test consiste à incuber la souche bactérienne dans le milieu Moeller à l'arginine afin de mettre en évidence la dégradation de l'arginine en ammoniac et amines qui alcalinisent le milieu. La réaction doit s'effectuer en anaérobiose.

- **Recherche de l'ornithine-décarboxylase (OCD) :**

Le test consiste à incuber la souche bactérienne dans le milieu Moeller à l'ornithine afin de mettre en évidence la dégradation de l'ornithine en putrescine une diamine primaire qui alcalinise le milieu. La réaction doit s'effectuer en anaérobiose.

- **Recherche de la lysine-décarboxylase (LDC) :**

Le test consiste à incuber la souche bactérienne dans le milieu Moeller à la lysine afin de mettre en évidence la dégradation de la lysine en cadavérine une diamine primaire alcalinise qui le milieu. La réaction doit s'effectuer en anaérobiose.

- **Recherche de la production du sulfure d'hydrogène (H_2S) :**

Il consiste à la réduction du thiosulfate de sodium en d'hydrogène sulfureux, qui se traduira par un dépôt noir.

- **Recherche de l'uréase et de la production de l'indole :**

Inoculation du milieu urée-indole par la suspension de la souche. Si la couleur du milieu vire vers le rouge, après 24h d'incubation à 37°C, donc uréase positive. Si la couleur reste jaune donc uréase négative.

La production de l'indole est ensuite recherchée en ajoutant quelques gouttes du réactif du Kovacs, une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface.

- **La tryptophane-désaminase :**

L'inoculation du milieu urée-tryptophane par la suspension bactérienne de la souche. L'hydrolase du tryptophane sera traduite par l'apparition d'un composé marron foncé en présence d'ions fer III.

- **La réaction de Voges-Proskauer (VP) :**

L'oxydation de l'acétoïne à l'air et en milieu alcalin (hydroxyde de potassium) produit de la butandione. Cette dernière donne, en présence d'α-naphtol, une réaction colorée spécifique rouge-rose dont l'intensité est augmentée par la créatine.

- **Recherche de la citrate perméase :**

Le citrate de *simmons* est ensemencé avec la suspension de la souche. Une bactérie sera citrate positif si elle alcalinise le milieu en utilisant le citrate. Cette réaction est indiquée par le changement de couleur de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol qui devient bleu.

- **Recherche de la gélatinase :**

La **gélatinase** ou **collagénase** est une enzyme qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides. Du charbon végétal est incorporé dans la masse des disques de gélatine. Ces disques sont placés dans une culture, en milieu liquide, de la bactérie à étudier. L'hydrolyse de la gélatine se traduit par la destruction du disque et la libération de particules de charbon dans le liquide qui prend une teinte noire.

- **Fermentation des sucres :**

Inoculation des microtubes contenant les hydrates de carbone et les polyols (D-glucose, D-mannitol, melibiose, D-sorbitol, L-rhamnose, L-arabinose, Inositol, le D-saccharose, etc) en forme déshydratée. Un virage de la couleur vers le jaune suite à l'acidification du milieu indique la fermentation du substrat.

Pour les substrats dont le sigle est encadré, la cupule doit aussi être remplie de manière à créer un ménisque. Pour les substrats dont le sigle est souligné, la cupule doit être remplie d'huile de paraffine soit pour créer l'anaérobiose (absence d'oxygène), soit pour maintenir en solution les ions volatils produits par la réaction et ainsi assurer le virage de l'indicateur coloré de pH.

Les creux du support de la galerie doivent être remplis d'eau pour former une chambre humide, puis la galerie est posée dans le support et le couvercle par dessus. L'ensemble est incubé à une température adaptée pendant 24 à 48h pendant 24h.

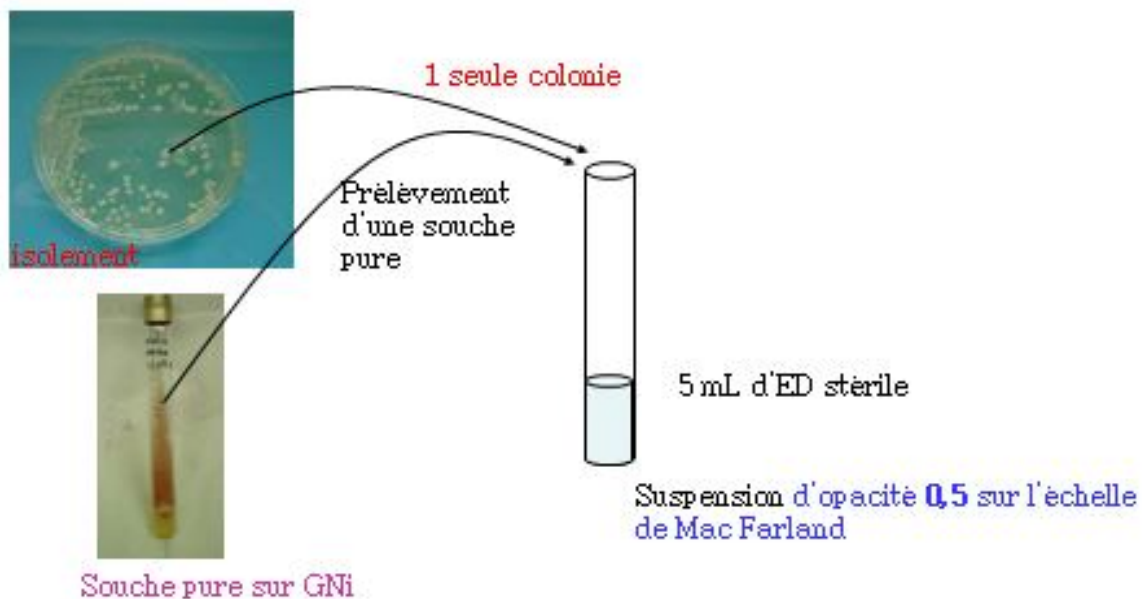


Figure 11: Préparation de l'inoculum.



Pour certains caractères:



Remplir de suspension le tube et la cupule
CIT, VP, GEL



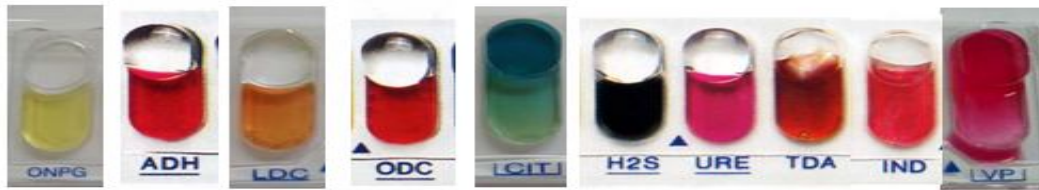
Remplir le tube de suspension et recouvrir d'huile de paraffine
ADH, LDC, ODC, H₂S, URE

Figure 12: Ensemencement de la galerie.

Tests négatifs



Tests positifs



Tests négatifs

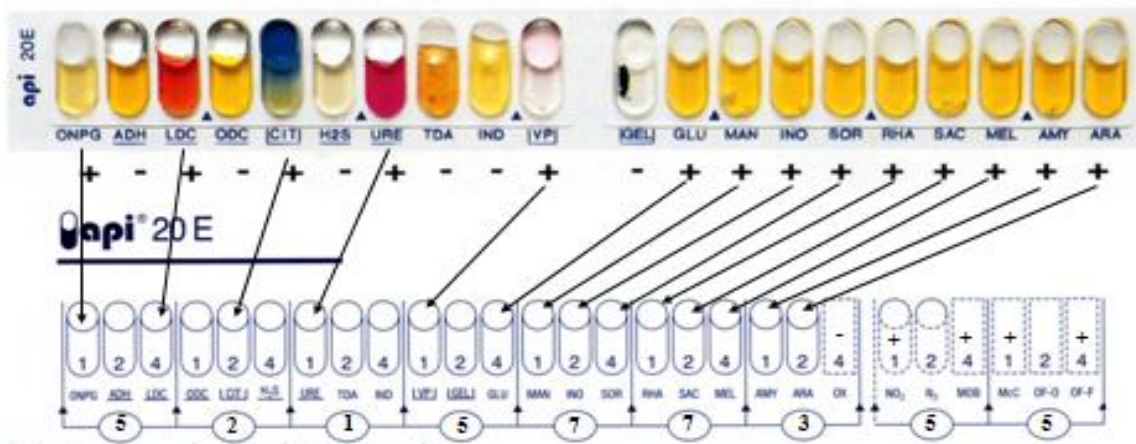


Tests positifs



Figure 13 : Lecture de la galerie.

Résultats de la galerie:



Résultats reportés sur la fiche d'identification

Code n°: 5 215 773 (55)	Ident.
-------------------------	--------

Se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code

Figure 14: Identification de la souche.

A pink, rounded rectangular shape with a blue dotted border. The text is centered within this shape.

RESULTATS

&

DISCUSSION

1. Echantillonnage :

Un prélèvement approprié est extrêmement important pour réussir la culture et l'identification des agents pathogènes. Cinq points de prélèvements ont été ciblés dans chaque crèche. Il s'agit des endroits les plus fréquentés et les plus touchés par les éducatrices ou les enfants (robinets de cuisines et de douches) ou les objets à usage collectif comme les jouets, les tables de lecture et les pots de toilettes pour bébé.

2. Enrichissement et isolement :

Avant de procéder à l'isolement et à la culture, une étape d'enrichissement a été nécessaire afin de favoriser la croissance des germes recherchés. L'apparition d'un trouble au niveau des écouvillons contenant le bouillon nutritif après 24 d'incubation signifie une croissance bactérienne.

Quatre milieux de culture ont été utilisés. Il s'agit d'une gélose ordinaire non sélective favorisant la croissance du maximum d'espèces bactériennes, une gélose au sang qui permet la culture des souches exigeantes, une gélose sélective pour les Gram positif (milieu Chapman) et une autre pour les Gram négatif (milieu Hektoen).

3. Dénombrement des colonies isolées :

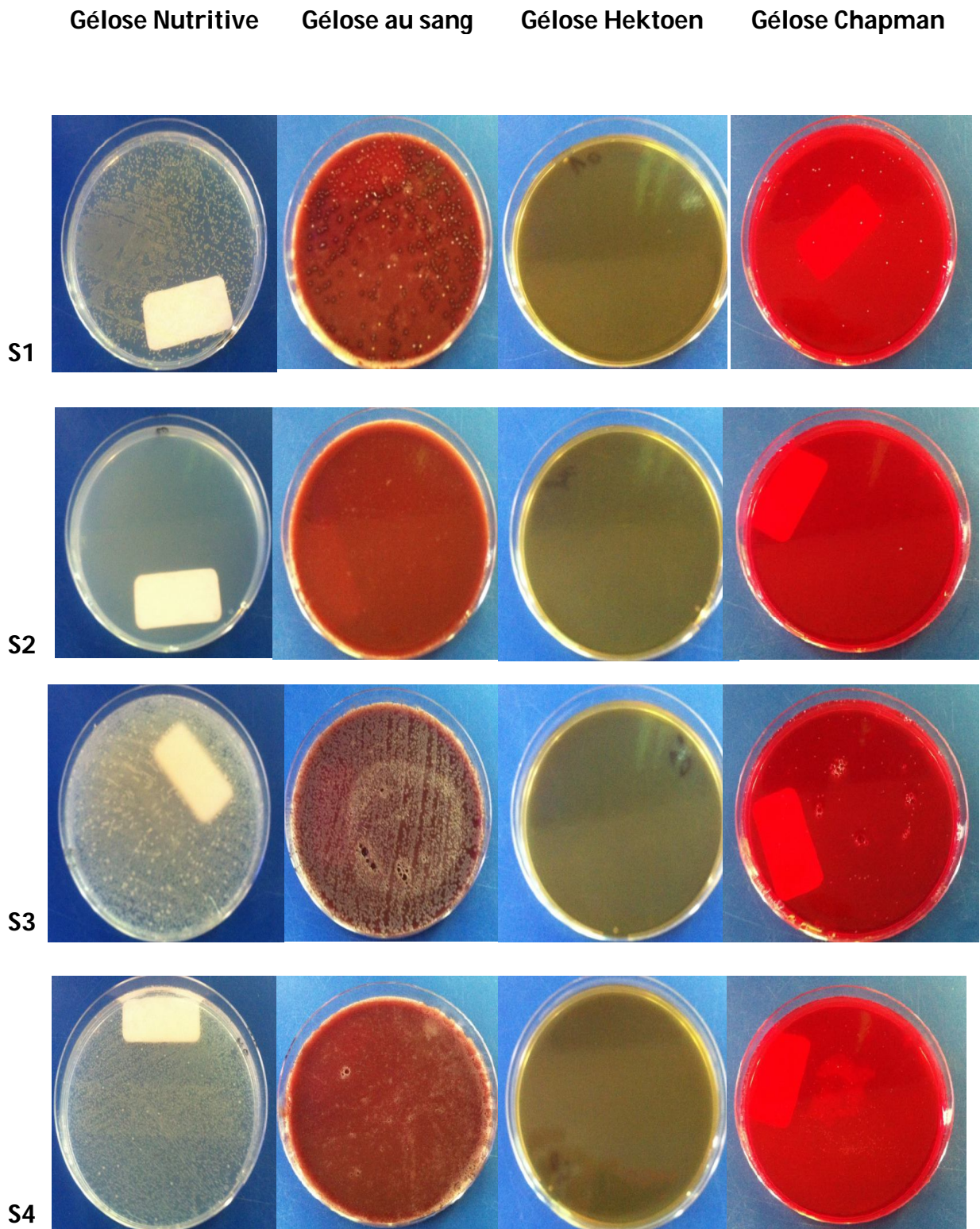
Après 24h d'incubation sur les milieux de culture, divers aspect de colonies ont été observé (**Photo 06**). Les résultats des dénombrements de chaque boîte de Pétri sont représentés dans les **tableaux 11 et 12**.

Tableau 11: Résultats du dénombrement des colonies isolées.

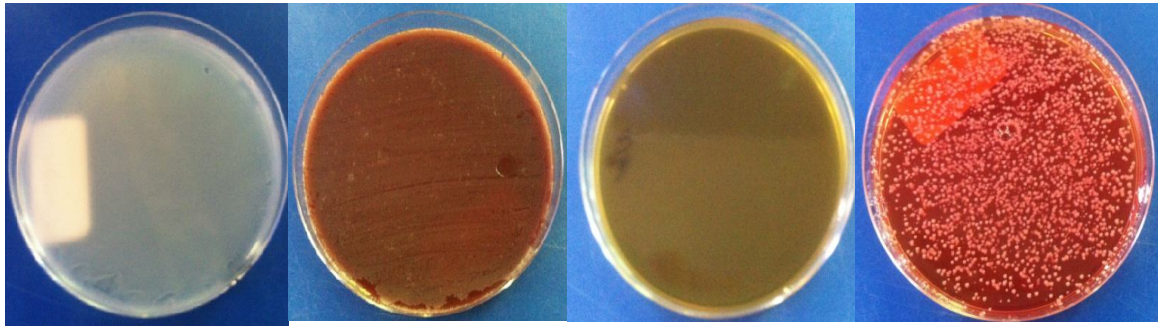
	G. nutritive	G. au sang	G. Hektoen	G. Chapman
S1	+++	+++	-	++
S2	-	-	-	-
S3	++++	++++	-	++
S4	++++	++++	-	++
S5	++++	++++	-	+++

(-) aucune pousse; (+) > 30 UFC; (++) > 100 UFC; (+++) > 300 UFC; (++++) indénombrables.

Photographie 06 : Aspect macroscopique des colonies isolées de la première crèche après 24 H d'incubation à 37°C.



S5



Une grande variation dans le dénombrement des colonies a été observée. La plupart des boîtes contenant la Gélose nutritive et la gélose au sang (60 %) ont montré des chiffres indénombrables des UFC. Ces résultats sont logiques vu la non-sélectivité des deux milieux. Cependant, le nombre de colonies n'a pas dépassé 200 UFC pour la plupart des boîtes de Chapman. Il faut également noter que les boîtes contenant la gélose Hektoen n'ont présenté aucune UFC ce qui prouve l'absence des germes à Gram négatif dans les cinq prélèvements.

Toutes les boîtes issues du deuxième site (table de lecture des enfants) sont montrées stériles. Cela reflète l'efficacité du nettoyage quotidien de cette dernière.

En revanche, l'échantillon prélevé à partir du dernier site (jouets) a donné des boîtes trop chargées en colonies pour les quatre milieux de culture. Ces résultats sont conformes avec une étude effectuée par des chercheurs états-uniens qui ont voulu explorer le risque associé aux biofilms présents sur les jouets pour la santé des enfants. Leurs résultats montrent que quatre peluches sur cinq (80%) étaient porteuses de *Streptococcus pneumonia* [41].

Tableau 12: Résultats du dénombrement des colonies isolées de la deuxième crèche.

	G. nutritive	G. au sang	G. Hektoen	G. Chapman
S1	++	+++	-	++
S2	+++	++	-	+++
S3	+++	++	++++	+
S4	++++	++	++	-
S5	++	++++	+	+

(-) aucune pousse; (+) > 30 UFC; (++) > 100 UFC; (+++) > 300 UFC; (++++) indénombrables.

Les boîtes de Pétri, résultant de la culture des prélèvements de la deuxième crèche, sont montrées moins chargées par rapport à celles de la première crèche. Cela valorise le rôle que joue la femme de ménage dans le maintien et la préservation de l'hygiène de l'établissement. Car un nettoyage quotidien, même s'il n'élimine pas tous les germes, il permet de réduire la charge microbienne et empêche la formation des couches des bio-films.

Bien qu'elles sont beaucoup moins chargées, **85%** des boîtes de Pétriensemencées ont présenté une pousse (60 % pour la première crèche). Nous avons également noté la présence des bacilles à Gram négatif dans les trois derniers points de prélèvement à savoir, les jouets, la table de lecture et la poignée du robinet de la cuisine. Cette variation est probablement due à l'effectif d'enfants au niveau de chaque crèche (**Tab 09**).

4. Etat frais et coloration de Gram :

Parmi les souches bactériennes isolées et purifiées, nous avons sélectionné 14 souches sur la base de caractères morphologiques, pour la poursuite de notre travail. Les résultats de l'étude de leurs caractères microscopiques et biochimiques sont réunis dans les tableaux **13, 14, 15 et 16**. (**Photo 08**).

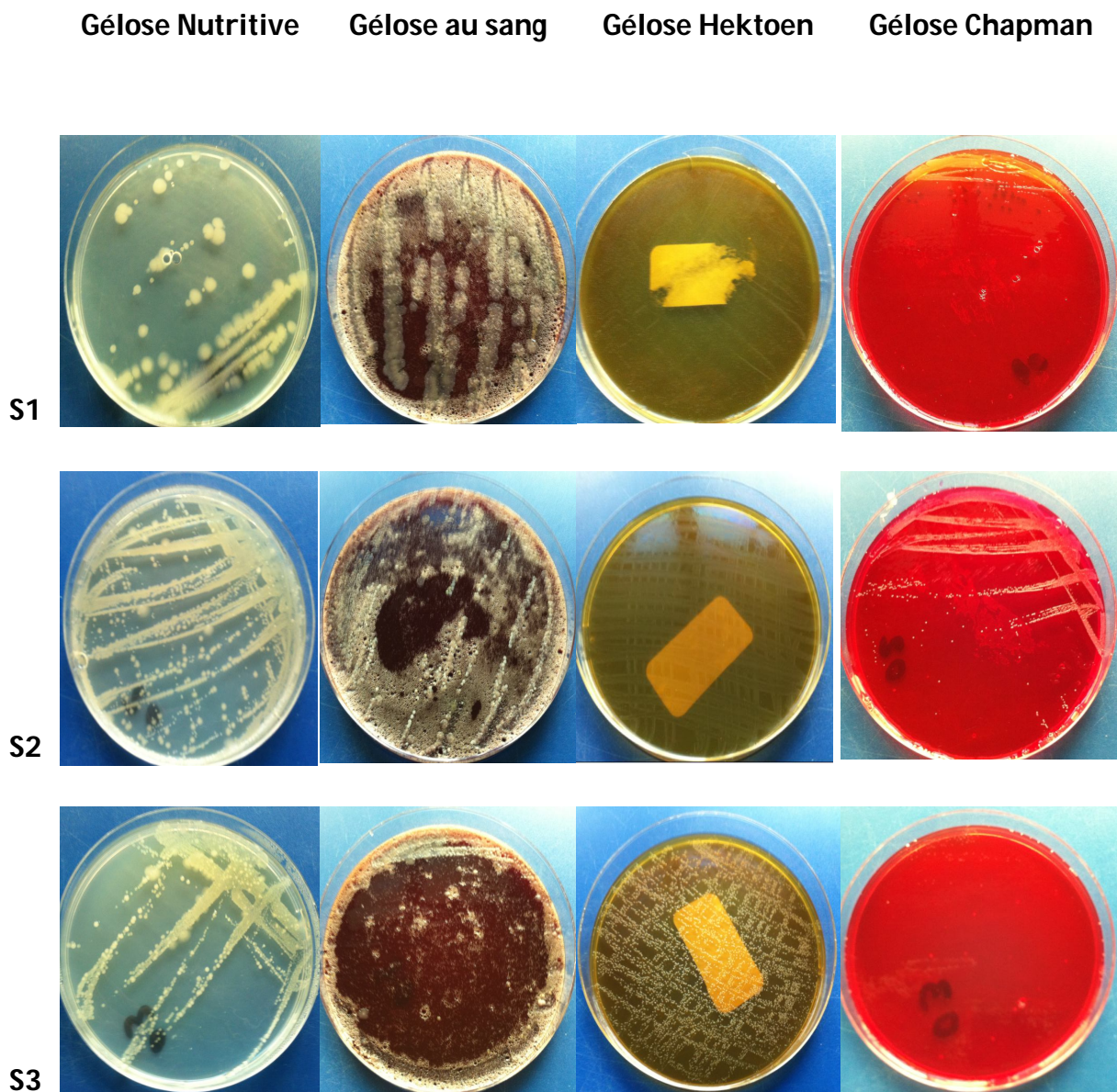
Tous les isolats sélectionnés à partir des boîtes de GN sont avérés de longs bâtonnets, à Gram positif, de mobilité variable, groupés en chaînettes plus ou moins longues, et qui ont tous donné un résultat positif pour le test de la catalase (**photo 04**). L'examen à l'état frais indique la présence d'endospores terminales chez la moitié des isolats.

Tableau 13: Caractères microscopiques et biochimiques des isolats sélectionnés à partir de la gélose nutritive.

	Forme	Mobilité	Gram	Regroupement	Sporulation	Catalase
Sp. 1N	Bacilles	mobiles	Positif	En chaînettes	Oui	Positif
Sp. 2N	Bacilles	mobiles	Positif	Lettres chinois	Oui	Positif
Sp. 3N	Bacilles	Immobilés	Positif	En chaînettes	Non	Positif
Sp. 4N	Bacilles	Immobilés	Positif	En chaînettes	Non	Positif

Trois types d'isolats ont été sélectionnés à partir de la gélose au sang. Les deux premiers sont des bacilles à Gram positif, de mobilité et de regroupement variables. Alors que le troisième type a montré des diplocoques à Gram positif alpha-hémolytiques (**Tab 14**).

Photographie 07 : Aspect macroscopique des colonies isolées de la deuxième crèche après 24 H d'incubation à 37°C.



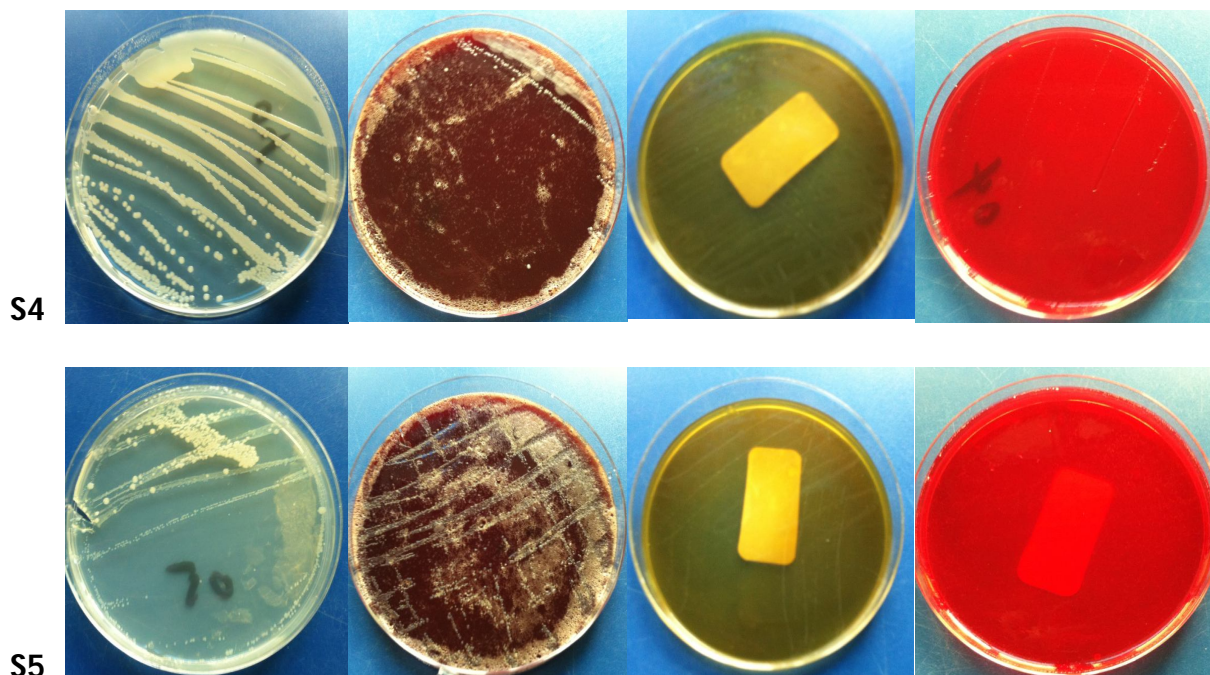


Tableau 14: Caractères microscopiques et biochimiques des isolats sélectionnés à partir de la gélose au sang.

	Forme	Mobilité	Gram	Regroupement	Hémolyse	Catalase
Sp. 1S	Bacilles	Mobiles	Positif	En chaînettes	α - hémolyse	Positif
Sp. 2S	Cocci	Immobilés	Positif	Diplocoques	α - hémolyse	Négatif
Sp. 3S	Bacilles	Immobilés	Positif	Diplobacilles	γ - hémolyse	Positif

La majorité des colonies apparues sur Chapman ont révélé des cocci à Gram positif regroupés en amas, incapables de dégrader le mannitol (petites colonies de couleur blanchâtre), ne possèdent pas de coagulase (**photo 09**), et possèdent une catalase (**Tab 15**).

Quelques colonies jaunes (Mannitol positif) ont été détectées, leur examen microscopique a montré des bâtonnets isolés à Gram positif, immobilés, catalase positifs.

Tableau 15: Caractères microscopiques et biochimiques des isolats sélectionnés à partir de la gélose Chapman.

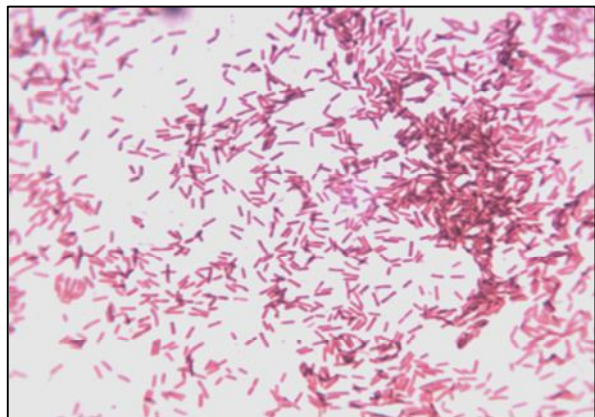
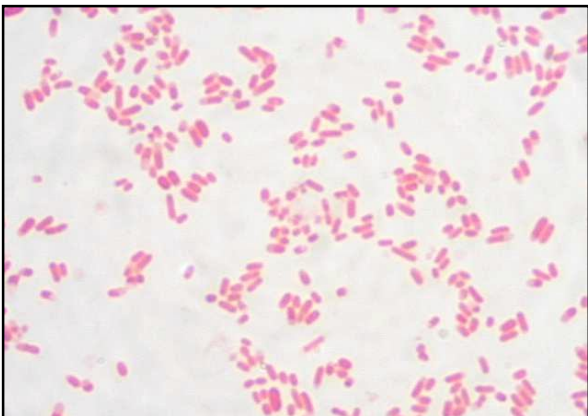
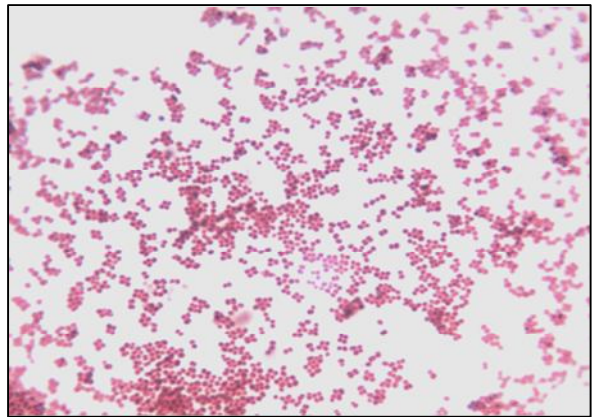
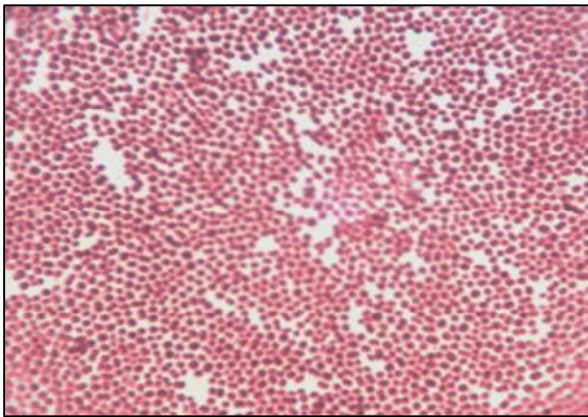
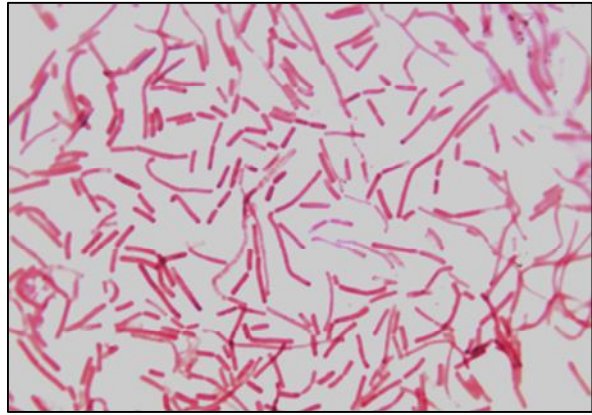
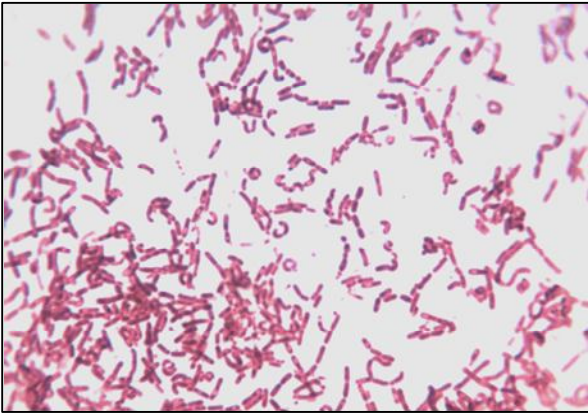
	Forme	Mobilité	Gram	Regroupement	Mannitol	Catalase	Coagulase
Sp. 1C	Cocci	Immobilés	Positif	En amas	Négatif	Positif	Négatif
Sp. 2C	Cocci	Immobilés	Positif	En amas	Négatif	Positif	Négatif
Sp. 3C	Cocci	Immobilés	Positif	En amas	Négatif	Positif	Négatif

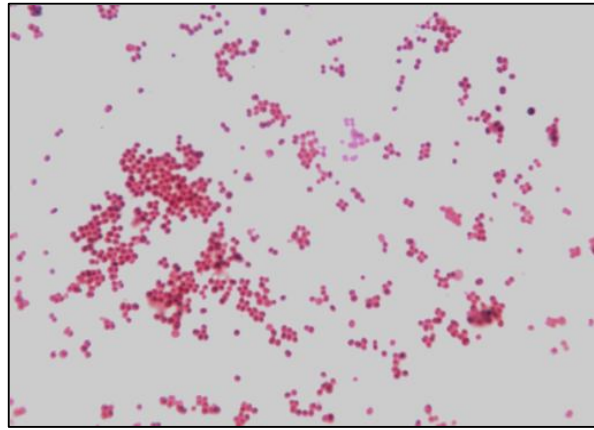
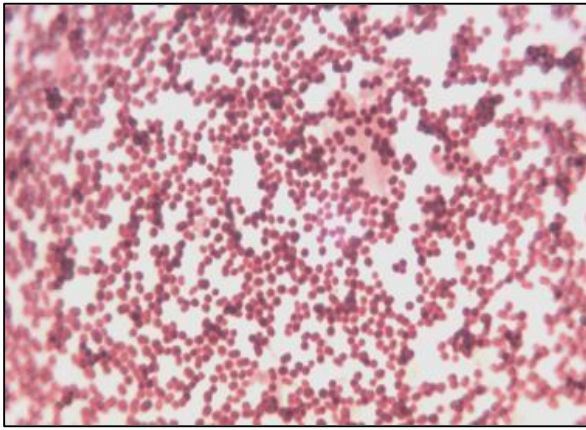
Sp. 4C Bacilles Immobiles Positif Isolés Positif Positif /

Seulement trois boîtes d'Hektoen ont été positives. La première contient des colonies jaunes (lactose positif) de taille moyenne. Les deux autres boîtes ont présenté des colonies vertes (lactose négatif) et de très petites tailles. L'examen microscopique a donné des bacilles isolés, immobiles et à Gram négatif (**Tab 16**). Les trois types de colonies ont fait l'objet d'une identification biochimique en utilisant des galeries Api 20^E. Les résultats sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 16 : Caractères microscopiques et biochimiques des isolats sélectionnés à partir de la gélose Hektoen.

	Forme	Mobilité	Gram	Regroupement	Lactose
Sp. 1H	Bacilles	Immobilés	Négatif	Isolés	Positif
Sp. 2H	Bacilles	Immobilés	Négatif	Isolés	Négatif
Sp. 3H	Bacilles	Immobilés	Négatif	Isolés	Négatif



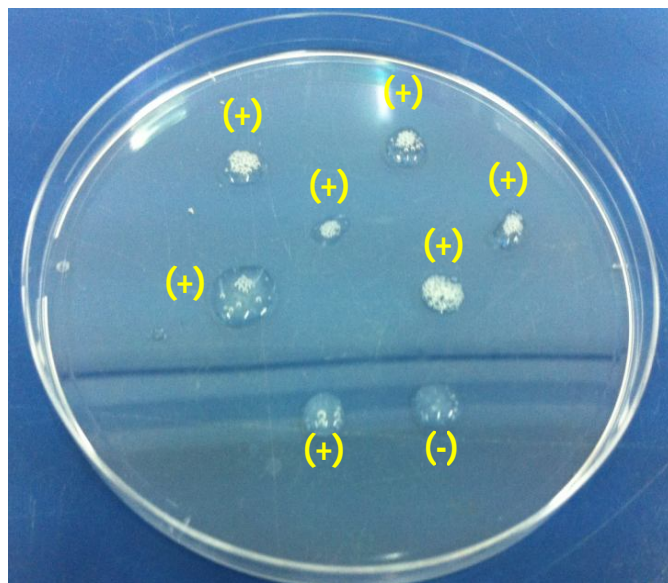
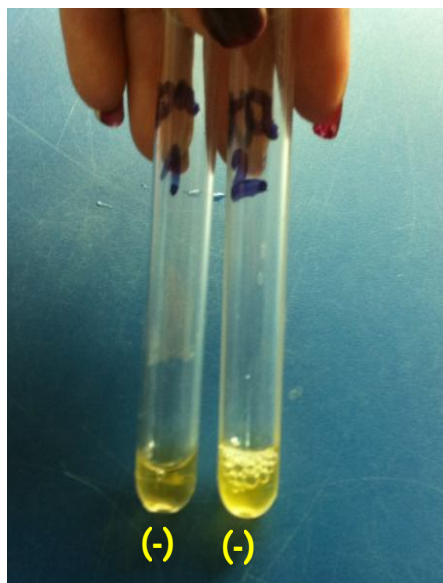


Photographie 08 : Résultats de la coloration de Gram.

Tableau 17 : Résultats de l'identification biochimique des Gram négatifs.

	<i>Sp1H</i>	<i>Sp2H</i>	<i>Sp3H</i>
ONPG	+	-	+
ADH	-	-	-
LDC	+	-	-
ODC	-	-	-
CIT	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
UREE	-	-	-
TDA	-	-	-
INP	-	-	-
VP	-	-	-
GEL	-	-	-

GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	-	+	-
SOR	-	+	-
RHA	+	+	+
SAC	+	+	+
MEL	+	-	+
AMY	+	+	+
ARA	+	-	+
Espèce	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Pantoea spp. 4</i>



Photographie 09 : Résultats de la recherche de la coagulase et de la catalase.

5. Identification des souches isolées :

On se basant sur les caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques des isolats, nous avons pu diviser les espèces et genres bactériens isolés à partir des deux crèches en cinq catégories (**Tab 18**).

Tableau 18 : Résultats de l'identification.

	Souches identifiées	Site d'isolement
Crèche I	<i>Bacillus</i>	Lavabo de douche, pot de toilette, jouets.
	<i>Corynebacterium</i>	Lavabo de douche.
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Robinet de cuisine, jouets.
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Robinet de cuisine, lavabo de douche, pot de toilette.
Crèche II	<i>Bacillus</i>	Robinet de lavabo de douche et de cuisine, pot de toilette.
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pot de toilette, jouets.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Jouets.
	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	Table de lecture des enfants.
	<i>Pantoea spp 4</i>	Robinet de cuisine.

La première catégorie est celle des bacilles à Gram et catalase positifs (BGP), sporulés et disposés en longues chaînettes. Ces propriétés sont caractéristiques au genre *Bacillus*. Les *Bacillus* sont des germes ubiquitaires de l'environnement car leurs spores leur confèrent une grande résistance. Ils sont fréquemment retrouvés dans le sol et dans quelques denrées alimentaires (riz, lait, viande). Le pouvoir pathogène des *bacillus* est généralement restreint. Cependant, quelques souches peuvent occasionner des toxi-infections alimentaires en collectivité, surtout chez les sujets fragiles.

Les résultats d'une enquête, effectuée en Aout 2012, ont révélé que *Bacillus cereus* était le germe responsable d'une intoxication alimentaire de 20 enfants, fréquentant une crèche à Borgehout (Belgique), après avoir consommé leurs repas [42].

La deuxième catégorie est composée de bacilles à Gram et catalase positifs, immobiles, sporulés et disposés en palissades et en lettres d'alphabet (V, N, L). Ces caractères nous ont fait penser au genre *Corynebacterium*.

Diverses espèces commensales sont décrites chez l'homme et l'animal. Le bacille de Klebs-Loeffler (*C. diphtheriae*) présente l'espèce-type responsable de la diphtérie. Il s'agit d'une sorte d'angine qui touche généralement les enfants de moins de 4 ans. Selon les Dr. **Longprt & Panneton (1929)**, les crèches sont particulièrement touchées par cette maladie. Ainsi, 643 certificats de décès ont été enregistrés à la crèche d'Youville (Canada) en 1925. [43].

Ces résultats soulignent l'importance et l'exigence de la vaccination contre ce type d'affections infantiles (diphtérie, tétanos, polio, tuberculose) pour les enfants et le personnel des crèches.

Ainsi, au cours du mois d'avril 2014, un cas de tuberculose a été identifié chez un professionnel travaillant au sein d'une crèche collective de la région Ile de France. L'investigation réalisée par le Centre de Lutte Anti Tuberculose (CLAT) auprès des 80 enfants de la crèche a permis d'identifier 7 enfants âgés de moins de 2 ans non vaccinés par le BCG. Susceptibles de développer une forme grave, ces enfants ont été mis sous traitement antibiotique durant deux mois [44].

La troisième catégorie des souches bactériennes identifiées dans nos crèches, regroupe des diplocoques à Gram positif (CGP), catalase négatif, immobiles et α -hémolytiques. Ces paramètres nous orientent vers l'espèce *Streptococcus pneumoniae*.

Les pneumocoques sont des bactéries qui se transmettent très facilement d'une personne à l'autre. Elles sont souvent propagées par les porteurs sains lors de contacts directs et étroits. La transmission se fait par voie aérienne ou orale via : la salive, les baisers, la toux, les éternuements, le partage d'aliments, de boissons, de jouets... *S. pneumoniae* est la principale bactérie responsable d'infections chez le jeune enfant. Cette dernière entraîne une mortalité d'un peu plus de 10 % chez les enfants de moins de 5 ans, essentiellement dans les pays du tiers-monde [45]. Plusieurs études ont montré 60-80% de portage chez les enfants fréquentant les crèches [46].

La quatrième catégorie montre des cocci à Gram positif disposés en amas ou en grappes de raisin, positifs à la [catalase](#), négatifs pour la [coagulase](#), se cultivent sur gélose Chapman et incapable de fermenter le mannitol. Ce sont les critères du Staph blanc ou *Staphylococcus epidermidis*.

Le caractère ubiquitaire du germe explique la fréquence élevée des infections staphylococciques. Ce sont les plus souvent en cause dans les otites moyennes chez les nourrissons de moins de 3 mois. L'impétigo staphylococcique du nourrisson, appelé également pemphigus épidémique des crèches, présente une forme de dermatose bactérienne très contagieuse engendrant des petites épidémies dans les crèches et pouponnières.

Un lavage régulier des mains reste le moyen le plus simple et le plus sûr de lutter contre ce type de germes. Une expérience a montré que des enfants soumis à une telle discipline « quatre lavages de mains seulement par jour, avant chaque repas » avaient été, en très peu de temps, victimes de deux fois moins d'infections dites "hivernales" classiques (rhumes, rhinites, bronchites, etc) que la moyenne).

La cinquième et dernière catégorie est présentée par trois bacilles à Gram négatif (BGN) appartenant à la famille des entérobactéries. Il s'agit de *Klebsiella pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* et *Pantoea spp. 4*.

Les infections à entérobactéries correspondent à la plus grande partie des infections bactériennes; ainsi on estime qu'elles sont impliquées dans 50% des cas de septicémie, 60 à 70% des entérites et 70% des cas des infections de la sphère urinaire. Tous les types de personnes sont exposés, mais certains sont plus sensibles. Les enfants de moins de trois ans et les personnes âgées (> 65 ans) ont plus de risque d'être infectés par les entérobactéries. *E. coli entéro-pathogènes* (EPEC) a été responsable de plusieurs épidémies gastroentérites infantiles aiguës en maternité ou en crèches chez les enfants de moins de 2ans [47].

Nombreuses études ont montré la prédominance du Genre *Klebsiella* dans les collectivités et les crèches, notamment *K. pneumoniae* responsable le plus souvent d'infections pulmonaires, ou urinaires. Quant à *Pantoea spp 4* (connue sous le nom: *Enterobacter agglomerans*) et *K. rhinoscleromatis* (agent du rhinosclérome), elles ont été responsables de septicémies néonatales et d'affections et respiratoires, respectivement.

La présence d'espèce d'entérobactériennes dont nos échantillons pourrait s'expliquer par une contamination d'origine fécale. Cette dernière est souvent liée aux activités de change de couches ainsi qu'au pot de toilettes destinées aux tout-petits.



CONCLUSION

Les crèches constituent toujours un milieu propice à la propagation des germes. De façon générale, un enfant de 6 à 30 mois porte ses doigts et d'autres objets à sa bouche toutes les 2 ou 3 minutes.

Plusieurs prélèvements ont été réalisés, par écouvillonnage, à partir d'endroits susceptibles les plus touchés, afin de mettre en évidence la présence d'éventuelles germes pathogènes au niveau de deux crèches privées situées dans la ville de Khenchela.

Les échantillons prélevés ont subi des pré-enrichissements avant qu'ils seront cultivés sur différents milieux de culture, à savoir une gélose ordinaire, une gélose au sang, gélose Hektoen et une gélose Chapman.

L'examen macroscopique des boîtes de Pétri après 24h d'incubation à 37°C a révélé une variation dans le dénombrement des UFC en fonction du milieu d'isolement et du site de prélèvement. Les jouets d'enfants sont montrés très chargés en germes par rapport aux autres sites avec pas moins de 300 UFC pour la plupart des boîtes. Considérés comme des nids à bactéries dangereuses pour la santé de l'enfant, un nettoyage adapté et hebdomadaire, au minimum, reste très recommandé pour cette catégorie d'objets.

Nos résultats ont également montré une variation remarquable, d'un point de vue quantitatif mais non qualitatif, de la charge bactérienne détectée à partir de chaque crèche. Cela a été expliqué par l'effectif d'enfants et la présence d'un agent chargé du ménage dans le cas de la deuxième crèche.

L'étude des caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques des isolats a permis d'identifier sept genres et espèces bactériennes à partir de nos prélèvements. Il s'agit de deux BGP (*Bacillus* et *Corynebacterium*), deux CGP (*Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus epidermidis*) et trois BGN (*Klebsiella pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* et *Pantoea spp. 4*).

En dépit du caractère inoffensif de la plupart des souches isolées. Ces dernières peuvent devenir très agressives dans certaines circonstances (diminution des défenses immunitaires, changement de site, etc) ce qui peut présenter un risque potentiel pour la santé des enfants.

D'une manière générale, nous pouvons conclure que les mesures d'hygiène sont plus ou moins respectées dans les deux crèches. Nous pensons cependant qu'un rappel régulier de la bonne pratique des règles d'hygiène est très nécessaire afin de s'opposer à la propagation des agents infectieux dans ce type d'établissements.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- 1- **Michèle Tabarot, 2002.** Grand Dictionnaire Terminologique Crèche_(enfant) Office québécois de la langue française.
- 2- **Rym N, 2012.** Normes et réglementation Crèches ; Publié dans Horizons.
- 3- **Ariane Raugel, 19/12/2013.** Bbbook.mon enfant a la crèche.les differents types de crèche..
- 4- **Philippe Ferrero , Septembre 2012.** Guide des conduites à tenir en cas de maladies infectieuses en collectivité.
- 5- **Patrick Poivre d'Arvor ; 2004.** Le livre bleu « L'enfant du premier âge » Edité par le Comité National de l'enfance.
- 6- **Masson, 1995.** Nouveaux cahiers de l'infirmière « HYGIENE » Masson
- 7- **Sylvie Dibos-Lacroux , (décembre 2007).** différents types d crèche, Reed Business Information
- 8- **D Soltani ; 09 - 10 – 2008.** Les crèches sous haute surveillance ; Réglementation de l'activité des centres d'accueil de la petite enfance ;
- 9- **Sophie Vansteenhuyse, 21/07/2011.** les crèches collective,
- 10- **DR Pierrick Hordé, Charles muller ,Claire Gabillat, Dr Paul Lemeut ,Dr David Elia, 12 Jun 2013''** Crèche (enfant) - Définition ,Santé Médecine,
- 11- **Christophe Lambert. Juillet 2005.** sécurité sanitaire dans les établissements de santé » version n° 5,
- 12- **Jean-Pierre Eskenaz, 6 Janvier 1978.** tout-savoir-sur-les-creches, N° 78-17
- 13- **Takala et al. Risk, 1995** .factors for primary invasive pneumococcal disease among children in Finland. JAMA. 15;273(11):859-864.
- 14- **Medjadji H, 03 - 04 – 2013.** pour non respect des normes du personnel non qualifié, espaces réduits, manque d'hygiène et de sécurité : plus de 100 mises en demeure adressés aux crèches.
- 15- **Donowitz (ed.): 1991.** Infection control in the child care center and preschool. Williams and Wilkins, Baltimore, (364 pp).
- 16- **GUEGUEN Cécile, T. LEVEAU Hélène, Privat 1993.** Rendez-vous, à la crèche,

17- michel poniatowski ; marie-madeleine dienesch ; 15 janvier 1974.article : Décret n°74-58. Relatif à la réglementation des pouponnières, des crèches, des consultations de protection infantile et des gouttes de lait.

18- toniolo maryne ; septembre 1998.Les rapports de l'AP-HP: Organisation des crèches hospitalières, p. 4.

19- Dégremont, 1978

20- Jean-Jacques Trégoat, 2009. guide pratique ; Collectivités de jeunes enfants et maladies infectieuses.

21- Sandrine. 2013. micro-crèche privé, la petite bulle, la structure de crèche,

22- P.Y. Guillaume; S. Riffard. 2004.Portail de la *microbiologie*.

23- Pierrick HORDE. Jeff Jean-François PILLOU. 09. janvier 2014. la santé et de la médecine. les agents infectieux.

24- Takala et al. Risk, 1995.factors for primary invasive pneumococcal disease among children in Finland. JAMA. 15;273(11):859-864

25- Simoes EA: RSV disease in the pediatric population: epidemiology, seasonal variability, and long-term outcomes. Manag Care 2008 ; 17: 3–6.

26- Principi N, Esposito S: 2004.Pediatric influenza prevention and control. Emerg Infect Dis;10: 574–580.

27- Lee MB, Greig JD: 2008.A review of enteric out-breaks in child care centers: effective infection control recommendations. J Environ Health;71: 24–32, 46.

28- chantal baudry huguette brezellec ,2006.microbiologie immunologie, 2eme édition. wolters kluwer France.

29- Gil Meyer Annelise Spack David Perrenoud Patricia Dumont ; (2009). La réception de la diversité des situations familiales par les crèches-garderies.

30- Odile Broglin. 7 juin 2010. *Infirmière puéricultrice et co-fondatrice de people&baby. la crèche de l'enfance.*

- 31- Avril, 1997 ; philipon, 2004 ; Bharat , 1996.**le pouvoir pathogène des bactéries
- 32- Benoît Parmentier****Chaussée de Charleroi, 2011.** La santé dans les milieux d'accueil de la petite enfance. 951060. Bruxelles D/74.80/34
- 33- Pilet et al. 1979, Pelmont, 1995 ; cunningham , 1987 ; Chartier ,1998 ; le minor, 1993, pelmont, 1995.**
- 34- de Martel, C. (2012).** Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. les agents infectieux..Lancet Oncology ; 13: 607-15
- 35- DIETER, Pauline DEPUYDT, Egill RICHARD et Théo REGNIER, 01 fev.2012.** 1S3 lycée de kerneuzec – TPE, bactérie et antibiotique.
- 36- Nicklin J, Graeme-Cook, K. Graeme-Cook, Paget .T. & Killington. R, 2000,**Les fonctions bactériennes essentielles, les plasmides,L'essentiel en microbiologie, édit. Berti, Paris.
- 37- Annesi-Maesano I, Oryszczyn MP, Godin J, Taytard A, Tunon de Lara JM, Charpin D, Vervloet D, Laurent AM et Le Moullec Y. 2000.**Impact de la pollution de l'air à l'intérieur et à l'extérieur des locaux sur la santé respiratoire et allergique de l'enfant dans des zones diverses de la France. Rapport intermédiaire.
- 38- Ada Mercier,** Modes de garde en crise,info bébé, N°: 433 934 312
- 39-Pierre-Carl, Langlais.2012.portail** microbiologie.Culture et isolement des microorganismes,p. 123-128
- 40- The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 2001-2009.**Bergey's ,Manual of Systematic Bacteriology - (anglais seulement), Deuxième édition, volumes 1 à 5.
- 41- Agnès Roux (2013).** Les jouets, des nids à bactéries dangereuses pour la santé. Futura Science (<http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/medecine-jouets-nids-bacteries-dangereuses-sante-51284/>).
- 42- Denuit J-P. (2012) ;** Résultats de l'enquête sur l'intoxication alimentaire du 28 août dans une crèche à Borgerhout. Communiqué de presse de l'agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire. 1P.
- 43-Longprt D. & Panneton P. (1929)** La diphtérie clandestine dans nos crèches.The canadian m\edical association journal. 203-207.
- 44- Vandentorren S. (2014)** Maladies à prévention vaccinale : alertes en Ile de France Infections invasives à méningocoque de type C, diphtérie et tuberculose. Le point épidémie. P 4.

- 45-O'Brien K.L., Wolfson L.J., Watt J.P. (2009)** Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. 374: 893-902.
- 46- Presles P. (2002)** Les crèches, vecteurs de méningites. *The Journal of infectious diseases*, 186 (11) : 1608-1614.
- 47- Cattoir V. (2005)** Les bacilles à Gram négatif (1). Cours de dcem1 - Faculté de médecine de crétei. 33p.



ANNEXEX

Annexe I : Composition des milieux de culture

•Gélose Hektoen

Protéose- peptone.....	12,0 g	Extrait de levure.....	3,0 g
Lactose.....	12,0 g	Saccharose.....	12,0 g
Salicine.....	2,0 g	Citrate de fer III et d'ammonium.....	1,5 g Sels
biliaires.....	9,0 g	Fuchsine acide.....	0,1 g Bleu de
bromothymol.....	0,065 g	Chlorure de sodium.....	5,0 g Thiosulfate de
sodium.....	5,0 g	Agar.....	13,0 g pH = 7,5

•Gélose nutritive

pH final à 25°C : 6,8 ± 0,2

Peptone.....	5,00
Extrait de viande de bœuf.....	3,00
Agar.....	15,00

•Gélose Chapman

pH final à 25°C : 7,4 ± 0,2

D-mannitol.....	10,00		
Chlorure de sodium.....	75,00	Peptone de viande.....	10,00
Agar.....	15,00	Rouge de phénol.....	0,025
Extrait de viande de bœuf.....	1,00		

•Gélose au sang

Mélange spécial de peptones.....	23 g	Sang de mouton.....	50 mL
Amidon.....	1	pH final =	7,3
NaCl.....	5g	Agar.....	10

• Bouillon nutritif

PH final à 25°C : 6,8 ± 0,2. Peptone 5,00.Extrait de viande de bœuf..... 3,00

Le milieu en flacons ou tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Annexe II : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E.

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultat	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-	B-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaun	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaun	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine	Jaun	Rouge/orangé
CIT	Citrate de Sodium	Utilisation du citrate	Vert	Bleu-vert/vert
H₂S	Thiosulfate de	Utilisation d'H ₂ S	Incolore/grisâtr	Dépôt noir/fin
URE	Urée	Uréase	Jaun	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane	TDA / Immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND / 2 min, max	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de Sodium	Production d'acétoine	VP 1 + VP 2 / 10 min	
			Incolore	Rose-rouge
GEL	Gélatine de Kohn		Non diffusion	Diffusion du
GLU	Glucose	Fermentation/oxydatio	Bleu-vert/vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydatio	Bleu-vert/vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydatio	Bleu-vert/vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydatio	Bleu-vert/vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydatio	Bleu-vert/vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydatio	Bleu-vert/vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydatio	Bleu-vert/vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydatio	Bleu-vert/vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydatio	Bleu-vert/vert	Jaune

Résumé

Afin d'explorer le risque infectieux associé aux collectivités, des prélèvements ont été effectués à partir de deux crèches privées de la ville de Khenchela. Après une étape d'enrichissement, les résultats de la culture ont révélé une charge bactérienne importante pour la plupart des sites notamment les jouets d'enfant (> 300 UFC). L'identification des isolats a montré la présence de sept genre et espèces bactériennes à savoir *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* et *Pantoea spp.* 4. Ces résultats nous incitent à intensifier les mesures de prévention et d'hygiène dans ce type d'établissements.

Mots clés : Collectivité, crèche, infection, bactérie, culture, identification.

Summary

To explore the risk of infection associated with communities, samples were taken from two private child care in the city of Khenchela. After an enrichment step, the culture results revealed a significant bacterial load for most sites including children's toys (> 300 CFU). The identification of the isolates showed the presence of seven bacterial species and genus : *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* and *Pantoea spp 4*. These results encourage us to intensify prevention and hygiene in such institutions.

Keywords: Community, child care, infection, bacteria, culture, identification.

ملخص

بهدف استكشاف خطر العدوى المرتبطة بالتجمعات، تم أخذ عينات من اثنين من رياض الأطفال الخاصة في مدينة خنشلة. بعد خطوة التخصيب، كشفت نتائج الزراعة حمولة كبيرة من البكتيرية بمعظم المواقع بما في ذلك لعب الأطفال (< 300 وحدة). أظهرت تحديد العزلات وجود سبعة أنواع البكتيريا : العصوية، الوتدية، العقدية الرئوية، المكورات العنقودية البشرية، الكلبسيلا الرئوية، التصلبية الأنفية و بوننتية. هذه النتائج تشجع على تكثيف الوقاية والنظافة في هذا النوع من المؤسسات.

الكلمات الرئيسية : التجمعات ، الحضانه ، العدوى ، البكتيريا ، الزراعة ، تحديد الهوية.